

Orsay série A
N° d'ordre : 417

Inscrit aux archives originales
du Centre de Documentation
G.N.R.S. sous le N°

THESES

A02775

PRESENTEES

A LA FACULTE DES SCIENCES

D'ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

ANNE D'ALBIS
née SEYDOUX de CLAUSSONNE

1ère Thèse : " ETUDE DES CHANGEMENTS DE CONFORMATION DE LA
TRYPSINE BOVINE ; LEUR INFLUENCE SUR LA FIXATION
D'INHIBITEURS COMPETITIFS PAR L'ENZYME .

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté .

Soutenues le 25 novembre 1968 devant la Commission d'Examen

M. J. TONNELAT

Président

M. R. WURMSER

M. B. LABOUESSE

Mlle S. GUINAND

Examineurs

T H E S E S

P R E S E N T E E S

A LA FACULTE DES SCIENCES

D'ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir

le grade de DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

A N N E D' A L B I S

1ère Thèse : " ETUDE DES CHANGEMENTS DE CONFORMATION DE LA
TRYPSINE BOVINE ; LEUR INFLUENCE SUR LA FIXATION
D'INHIBITEURS COMPETITIFS PAR L'ENZYME .

2ème Thèse : Propositions données par la Faculté .

Soutenues le 25 novembre 1968 devant la Commission d'Examen

M. J. TONNELAT

Président

M. R. WURMSER

M. B.LABOUESSE

Mlle S.GUINAND

Examineurs



Le présent travail a été effectué au laboratoire de Biologie Physico-Chimique de la Faculté des Sciences d'Orsay.

Je suis très heureuse de pouvoir exprimer ici à Monsieur le Professeur TONNELAT toute ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle il m'a accueillie et m'accueille encore dans son laboratoire. C'est à lui que je dois d'avoir entrepris cette thèse et je lui en suis profondément reconnaissante. Je le remercie de m'avoir par son enseignement si ~~rigoureux~~ initiée à la biologie physico-chimique et de m'avoir guidée dans mes recherches tout en me laissant une grande initiative personnelle. Qu'il me permette de lui exprimer mon sincère attachement.

Mademoiselle GUINAND, maître de recherches au CNRS, a dirigé ce travail. Elle a été la compagne des bons et ~~des~~ mauvais jours, m'a constamment prodigué ses judicieux conseils et m'a fait bénéficier de sa grande expérience. Qu'elle me permette de lui témoigner ma vive gratitude et ma respectueuse affection.

J'ai trouvé en Monsieur le Professeur WURMSER le parrain le plus attentif à mon travail et le plus disponible à toutes les conversations. Je le remercie sincèrement du grand honneur qu'il me fait en acceptant de faire partie du jury d'examen de cette thèse. Je voudrais l'assurer de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse admiration.

Je suis également reconnaissante à Monsieur le Professeur LABOUESSE d'avoir bien voulu faire partie de mon jury. Je voudrais lui exprimer, ainsi qu'à Madame LABOUESSE, maître de recherches au CNRS, toute ma gratitude pour l'aide qu'ils m'ont apportée au cours de mon travail par leur esprit critique et leur rigueur scientifique incomparables. Je tiens à les assurer du grand regret que me cause leur départ.

J'aimerais maintenant souligner que tous mes amis du Département de Biochimie et de Biophysique ont contribué à la réalisation de cette thèse. Je citerais tout particulièrement Monsieur BECHET avec lequel j'ai effectué une partie de ce travail ; j'ai vivement apprécié son esprit de synthèse, sa foi dans l'expérience et ses hautes connaissances scientifiques et je le remercie sincèrement pour cette collaboration.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Avec Monsieur ARRIO, assistant, j'ai eu de longues et utiles discussions ; qu'il croie à mes remerciements très amicaux.

Madame JACQUOT, chargée de recherches au CNRS, m'a été constamment secourable ; toujours disponible et confiante, elle sait créer au laboratoire une atmosphère dynamique et gaie. Qu'elle me permette de lui exprimer mon affectueuse gratitude.

Je tiens enfin à remercier Monsieur PANTALONI, chargé de recherches au CNRS, pour les innombrables discussions que nous avons eues ensemble et les inappréciables conseils qu'il m'a constamment et généreusement donnés. Je voudrais l'assurer de ma profonde et reconnaissante amitié.

Les mesures d'ultracentrifugation analytique et la dactylographie de cette thèse sont dues à l'irremplaçable compétence de Mademoiselle BARNEOUD ; je lui exprime mes remerciements les plus amicaux, ainsi qu'à tous ceux qui, de multiples façons, m'ont apporté une aide dans mon travail.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
METHODES D'ETUDE	5
MATERIEL ET TECHNIQUES	13
RESULTATS	18
 <u>Première partie. Etude de la conformation et des changements</u>	
<u>de conformation de la trypsine libre.</u>	18
A. Effet du pH sur la structure de la trypsine entre pH 1,2 et 13 .	18
I. Propriétés rotatoires	18
II. Propriétés spectrales	33
III. Conclusion	39
B. Effet de la température sur la structure de la trypsine entre pH 1 et 3,7.	42
C. Effet de la concentration en protéine sur la structure tertiaire et quaternaire de la trypsine à pH 2,1 et à pH 4,8.	48
 <u>Deuxième partie. Etude de la fixation d'inhibiteurs com-</u>	
<u>pétitifs par les différentes formes de</u>	
<u>la trypsine, entre pH 1,5 et 12,5 .</u>	54
I. Etude aux pH neutres, entre pH 5 et 8,5	55
II. Etude aux pH acides	57
III. Etude aux pH alcalins	67
IV. Conclusion	72
 CONCLUSION	 75
BIBLIOGRAPHIE	77

I N T R O D U C T I O N

Les enzymes sont des protéines qui possèdent la propriété remarquable d'être des catalyseurs biologiques. L'étude des relations qui existent entre leur structure de protéine et leur fonction d'enzyme revient à celle des relations qui existent entre l'ensemble de la chaîne polypeptidique et le centre actif constitué d'un nombre limité d'acides-aminés.

Le but du travail exposé ici a été d'apporter une contribution à cette étude dans le cas d'un enzyme protéolytique, la trypsine (EC.3.4.4.4.).

Dans un premier temps, nous nous sommes attachée à l'étude de la conformation de la trypsine libre en solution et à celle des modifications de cette conformation sous l'action de différents facteurs, comme la concentration en ions H^+ du milieu, la température ou la concentration en protéine. Cette première partie de notre travail peut permettre de mettre en évidence quels sont les résidus d'acides-aminés qui contrôlent la conformation de la protéine.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les modifications de conformation de la trypsine sous l'influence de la fixation d'inhibiteurs compétitifs de l'enzyme. Cette deuxième partie de notre travail a été effectuée en collaboration avec Jean-Jacques Béchet ¹ ; elle peut permettre de mettre en évidence quels sont les résidus d'acides-aminés qui contrôlent la fixation du substrat par l'enzyme.

L'intérêt du choix de la trypsine comme matériel d'étude en tant que protéine d'une part et d'enzyme d'autre part est lié à diverses raisons.

1) La séquence en acides-aminés de la protéine était partiellement élucidée quand nous avons entrepris ce travail ; elle est maintenant parfaitement connue grâce aux travaux des équipes de Neurath ² et de Sörm ³. La protéine, de poids moléculaire 23 500 , est constituée de

223 acides-aminés parmi lesquels on trouve un nombre relativement élevé de chromophores aromatiques (10 tyrosines, 4 tryptophanes et 3 phénylalanines) ; il n'y a aucun groupement sulfhydryle mais six ponts disulfures.

Jusqu'à ces derniers mois, on pensait que la seule molécule de trypsine fonctionnelle était celle qui est constituée d'une chaîne unique et qui provient du trypsinogène par rupture de la liaison peptidique entre l'hexapeptide N terminal et l'isoleucine 7 du zymogène (tableau 1, p.3). Or, Labouesse et Gervais⁶ d'une part, Maroux et al.⁷ d'autre part, ont mis en évidence indépendamment qu'il existait également une molécule de trypsine à deux chaînes, " active " selon les derniers auteurs, ayant outre l'isoleucine 7 une seconde extrémité N terminal, la valine 106. Par ailleurs, Schroeder et Shaw⁸ ont montré tout récemment que, au cours de l'activation autocatalytique du trypsinogène, il se formait, à côté de la molécule β à une seule chaîne, une quantité importante d'une autre protéine à deux chaînes, dénommée α , ayant comme extrémité N terminal supplémentaire la sérine 132 ; cette seconde coupure entraîne une certaine diminution des activités amidasique et estérasique de l'enzyme.

2) La trypsine est un enzyme qui fonctionne sans coenzyme ni groupement prosthétique ; elle fait partie des enzymes protéolytiques à "sérine active" ⁹, catégorie d'enzymes dans laquelle entre également la chymotrypsine. Celle-ci a été particulièrement étudiée, tant du point de vue de son activité catalytique que de sa structure tridimensionnelle, par de très nombreux chercheurs. Les séquences en acides-aminés de la trypsine et de la chymotrypsine présentant un très grand nombre d'analogies, la comparaison des résultats obtenus lors de l'étude des deux enzymes en a souvent facilité l'interprétation et favorisé la poursuite.

3) Enfin, l'étude du mécanisme de l'activité catalytique de la trypsine a été et est encore un des centres d'intérêt de recherche de nombreuses équipes et en particulier de celle de J.Yon. On sait que la trypsine catalyse essentiellement l'hydrolyse des liaisons peptidiques, amides

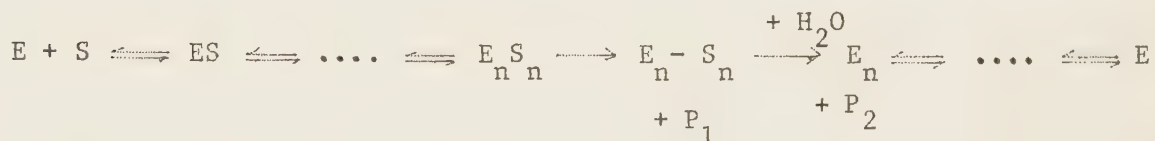
T A B L E A U 1

Séquence primaire du trypsinogène de boeuf ³.

Val.	Asp.	Asp.	Asp.	Asp.	Lys.	↕ Ile.	Val.	Gly.	Gly.	Tyr.	Thr.	Cys.	Gly.	Ala.
1				5					10					15
Asn.	Thr.	Val.	Pro.	Tyr.	Gln.	Val.	Ser.	Leu.	Asn.	Ser.	Gly.	Tyr.	His.	Phe.
16				20					25					30
Cys.	Gly.	Gly.	Ser.	Leu.	Ile.	Asn.	Ser.	Glu. ⁴	Trp.	Val.	Val.	Ser.	Ala.	Ala.
31				35					40					45
His.	Cys.	Tyr.	Lys.	Ser.	Gly.	Ile.	Gln.	Val.	Arg.	Leu.	Gly.	Gln.	Asp.	Asn.
46				50					55					60
Ile.	Asn.	Val.	Val.	Glu.	Gly.	Asn.	Gln.	Gln.	Phe.	Ile.	Ser.	Ala.	Ser.	Lys.
61				65					70					75
Ser.	Ile.	Val.	His.	Pro.	Ser.	Tyr.	Asn.	Ser.	Asn.	Thr.	Leu.	Asn.	Asn.	Asp.
76				80					85					90
Ile.	Met.	Leu.	Ile.	Lys.	Leu.	Lys.	Ser.	Ala.	Ala.	Ser.	Leu.	Asn.	Ser.	Arg. [↑]
91				95					100					105 [↓]
Val.	Ala.	Ser.	Ile.	Ser.	Leu.	Pro.	Thr.	Ser.	Cys.	Ala.	Ser.	Ala.	Gly.	Thr.
106				110					115					120
Gln.	Cys.	Leu.	Ile.	Ser.	Gly.	Trp.	Gly.	Asn.	Thr.	Lys. [↑]	↕ Ser.	Ser.	Gly.	Thr.
121				125					130					135
Ser.	Tyr.	Pro.	Asp.	Val.	Leu.	Lys.	Cys.	Leu.	Lys.	Ala.	Pro.	Ile.	Leu.	Ser.
136				140					145					150
Asn. ⁵	Ser.	Ser.	Cys.	Lys.	Ser.	Ala.	Tyr.	Pro.	Gly.	Gln.	Ile.	Thr.	Ser.	Asn.
151				155					160					165
Met.	Phe.	Cys.	Ala.	Gly.	Tyr.	Leu.	Glu.	Gly.	Gly.	Lys.	Asn.	Ser.	Cys.	Gln.
166				170					175					180
Gly.	Asp.	Ser.	Gly.	Gly.	Pro.	Val.	Val.	Cys.	Ser.	Gly.	Lys.	Leu.	Gln.	Gly.
181				185					190					195
Ile.	Val.	Ser.	Trp.	Gly.	Ser.	Gly.	Cys.	Ala.	Gln.	Lys.	Asn.	Lys.	Pro.	Gly.
196				200					205					210
Val.	Tyr.	Thr.	Lys.	Val.	Cys.	Asn.	Tyr.	Val.	Ser.	Trp.	Ile.	Lys.	Gln.	Thr.
211				215					220					225
Ile.	Ala.	Ser.	Asn.											
226														

Ponts disulfures : 13 - 143 ; 31 - 47 ; 115 - 216 ; 122 - 189 ; 154 - 168 ; 179-203.

ou esters au niveau du carboxyle de l'arginine ou de la lysine. Il est maintenant démontré que l'hydrolyse des substrats a lieu par l'intermédiaire d'un complexe covalent¹⁰ selon le schéma suivant :



La fixation du substrat sur l'enzyme est assurée à la fois par une liaison électrostatique entre la charge positive du site de fixation de S et un groupe anionique de E^{11-14,1} et par une interaction entre la portion aromatique ou aliphatique de S et une zone hydrophobe de E^{11,12}.

La transformation du complexe de Michaelis en acylenzyme E-S se fait vraisemblablement par l'intermédiaire de un ou plusieurs complexes $E_1 S_1$, $E_2 S_2$, ..., $E_n S_n$, dans lesquels la conformation de l'enzyme^{15,16} et celle du substrat sont modifiées.

L'implication d'une histidine comme catalyseur acide-base a été mise en évidence par cinétique enzymatique^{17,18} ; le marquage chimique (p.toluène-sulfonyl-lysine chlorométhyl cétone ou TLCK) a montré qu'il s'agissait de l'histidine 46 réf. 19,20. La même technique (diisopropylfluorophosphate ou DFP)²¹ a permis d'identifier que c'était la sérine 183 réf. 2,3 qui intervenait dans le mécanisme catalytique comme agent acylant.

Il a été montré plus récemment que, à côté du résidu anionique du site de fixation et de l'histidine 46 du site catalytique, un troisième groupement ionisable, de pK environ 10, participait à l'activité enzymatique de la trypsine²²⁻²⁴.

Nous avons donc bénéficié, au cours de notre étude sur les différentes conformations que présente la trypsine en solution, d'une connaissance de plus en plus approfondie de la structure primaire et de la fonction enzymatique de la trypsine et de la chymotrypsine, à laquelle il faut ajouter dans le cas de ce dernier enzyme celle de la structure tertiaire^{25,26}.

M E T H O D E S D ' E T U D E

I. ETUDE DE LA STRUCTURE DE LA TRYPSINE.

1. Etude de la structure secondaire et tertiaire.

a. *Polarimétrie et spectropolarimétrie.*

L'expression du pouvoir rotatoire dans les zones de longueurs d'onde éloignées des bandes d'absorption optiquement actives (effets Cotton) d'une molécule asymétrique a été donnée par Drude ²⁷:

$$[\alpha]_{\lambda} = \sum_i \frac{K_i}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

où $[\alpha]$: pouvoir rotatoire spécifique = $\frac{\alpha \cdot 10^3}{d_{\text{dm}} c_{\text{g/ml}}}$

λ_i : longueurs d'onde des transitions électroniques optiquement actives

K_i : constantes proportionnelles aux forces rotatoires des différentes transitions

λ : longueurs d'onde de mesure, éloignées de λ_i .

La dispersion rotatoire d'un grand nombre de protéines pauvres en hélice α obéit à la relation simple de Drude à un terme : $[\alpha]_{\lambda} = \frac{A}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$ où λ_c et A ne représentent que des valeurs moyennes et n'ont donc aucune signification physique. La valeur de λ_c est reliée empiriquement au pourcentage en hélice α , H_{α} , de la molécule protéique :

$$H_{\alpha} = \frac{\lambda_c - 212}{40} .$$

L'équation de Drude à un seul terme ne rend pas compte de la dispersion rotatoire des polypeptides synthétiques complètement enroulés en hélice α ; Moffitt ²⁸ a alors proposé l'équation suivante à deux termes :

$$[R']_{\lambda} = \frac{a_o \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o \lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2}$$

où $[\bar{R}']$: pouvoir rotatoire spécifique par résidu d'acide-aminé rapporté au vide = $\left(\frac{3}{n^2 + 2} \right) \frac{M}{100} [\alpha]_\lambda$

M : masse moléculaire moyenne du résidu (M = 106, dans le cas de la trypsine)

n : indice de réfraction du milieu

b_0 est une constante caractéristique du taux en hélice α . Si on utilise pour λ_0 la valeur de 212 m μ , $b_0 = -700$ pour 100 % d'hélice α droite et $b_0 = +100$ pour 100 % de pelote statistique. Dans le cas d'une molécule qui ne contient que de l'hélice α et de la pelote statistique,

$$H_\alpha = - \frac{b_0 - 100}{8}$$

a_0 est une constante dont la valeur dépend de la composition en acides-aminés de la protéine et des interactions de ceux-ci avec le solvant.

L'équation de Moffitt repose sur l'hypothèse que le pouvoir rotatoire dans la zone visible et ultraviolette proche provient essentiellement des deux transitions électroniques $\Pi \rightarrow \Pi^*$ du groupe amide, relatives aux bandes d'absorption situées respectivement à 190 et à 150 m μ .

Plus récemment, dans une série d'articles, Blout, Carver et Shechter²⁹ ont proposé une équation du même type que celle de Drude modifiée par Moffitt pour rendre compte des dispersions rotatoires des protéines ou des polypeptides constitués d'un mélange d'hélice α et de pelote statistique. D'après ces auteurs, la transition $\Pi \rightarrow \Pi^*$ relative à la bande d'absorption située à 150 m μ ne doit avoir aucun effet sur le pouvoir rotatoire dans le visible et l'ultraviolet proche ; celui-ci doit correspondre à deux effets Cotton situés à 193 m μ et 225 m μ dans le cas de l'hélice α et à 198 et 225 m μ dans le cas de la pelote statistique. L'équation de Drude à deux termes est modifiée de la façon suivante :

$$[\bar{R}'] = A_{193} \frac{\lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + A_{225} \frac{\lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}$$

où A_{193} et A_{225} sont proportionnels au pourcentage en hélice α :

$$H_{\alpha} = \frac{A_{193} + 750}{36,5} = \frac{A_{225} + 60}{-19,9}$$

Blout et al. ont établi les relations existant entre les coefficients des équations de Drude et de Moffitt et ont démontré que les valeurs de b_0 d'une part et de $(A_{193} - A_{225})$ d'autre part étaient caractéristiques du pourcentage en hélice α d'une protéine, indépendamment du solvant.

Sauf dans le cas où d'autres effets Cotton que ceux situés au niveau de la bande d'absorption du groupe amide envisagés ci-dessus contribuent à la rotation optique, l'étude dans la zone visible et ultraviolette proche de la dispersion rotatoire d'une protéine apporte donc des renseignements précis sur la structure secondaire de cette protéine, à condition que celle-ci soit constituée exclusivement d'hélice α et de pelote statistique. Si les équations de Moffitt ou de Drude ne s'appliquent pas, on peut conclure que la protéine étudiée ne contient pas uniquement des structures en hélice α et en pelote statistique.

L'étude, soit par polarimétrie, soit par dichrographie circulaire, des effets Cotton au niveau des bandes d'absorption optiquement actives, donne de la même façon des renseignements sur la structure secondaire d'une protéine. Les effets Cotton caractéristiques de polypeptides synthétiques en hélice α , en pelote statistique et également en structures β ont été étudiés par de nombreux auteurs. Greenfield et al.³⁰ en particulier ont déterminé par le calcul quelle devait être l'allure des courbes d'effet Cotton selon les proportions des différentes structures dans une protéine. C'est ainsi que, par exemple, l'amplitude de l'extrémum négatif à 233 m μ de l'effet Cotton centré à 225 m μ est proportionnel au contenu en hélice α d'une protéine constituée seulement d'hélice α et de pelote statistique :

$$H_{\alpha} = \frac{[R']_{233} + 2\,000}{-13\,000} .$$

Comme précédemment l'application de cette méthode à la détermination de la structure secondaire d'une protéine est limitée par l'existence éventuelle dans cette protéine de structures différentes de celles des structures modèles.

Comme nous venons de le voir, la dispersion rotatoire apporte des renseignements très précis sur la structure secondaire d'une protéine, mais seulement dans un nombre de cas limité. Par contre, l'étude des modifications des propriétés rotatoires d'une protéine sous l'effet de la fixation d'un ligand (proton, ion, inhibiteur,...) ou en fonction d'un paramètre quelconque (temps, température,...) apporte toujours des renseignements sur les relations entre les changements de conformation subis par la protéine et l'action de l'effecteur utilisé. D'autre part, des effets Cotton liés à l'absorption de chromophores autres que la liaison peptidique, comme les résidus aromatiques par exemple, donnent des indications sur l'environnement de ces acides-aminés dans la molécule protéique.

b. *Spectrophotométrie d'absorption.*

Le spectre d'absorption d'une protéine entre 250 et 300 mμ est dû essentiellement aux acides-aminés aromatiques et pour une part très faible aux ponts disulfures de la molécule. Les bandes d'absorption de la phénylalanine et de la tyrosine correspondent à des transitions électroniques $\Pi \rightarrow \Pi^*$, celles du tryptophane à deux transitions indépendantes, l'une $\Pi \rightarrow \Pi^*$ et l'autre, moins importante, vraisemblablement $n \rightarrow \Pi^*$. Or, toute modification de l'indice de réfraction du solvant entraîne généralement une variation de l'intensité et un déplacement des bandes d'absorption du chromophore, dans deux sens opposés suivant qu'il s'agit de transitions $n \rightarrow \Pi^*$ ou $\Pi \rightarrow \Pi^*$. Par conséquent, de même que pour l'activité optique, tout changement des propriétés spectrales des chromophores en fonction des conditions du milieu pourra être relié à un changement de leur environnement et donc à une modification de la structure tertiaire de la protéine ³¹.

Les différences extrêmement importantes que présentent les spectres d'absorption de la tyrosine dont la fonction phénol est ionisée ou non permettent d'autre part de déterminer les constantes d'ionisation des tyrosines d'une protéine³¹.

2. Etude de la structure quaternaire.

a. *Diffusion de la lumière.*

La détermination de la masse d'une molécule en solution peut être obtenue à partir de la mesure de l'intensité de la lumière diffusée par cette solution. La relation entre ces deux grandeurs a été donnée par Debye³² : $\frac{Kc}{I_{\theta}} = \frac{1}{M} + 2 B c$

où M : masse moléculaire du corps dissous,

c : concentration en mg/ml,

B : coefficient d'interaction moléculaire,

I_{θ} : intensité diffusée observée dans une direction faisant un angle θ avec la lumière incidente,

et

$$K = \frac{4 \pi^2}{\lambda^4 N} I_0 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

où λ : longueur d'onde de la lumière incidente dans le vide,

N : nombre d'Avogadro,

I_0 : intensité incidente,

n_0 : indice de réfraction du solvant,

$\frac{dn}{dc}$: incrément d'indice de la solution .

Dans le cas d'une molécule comme la trypsine dont les dimensions sont faibles devant la longueur d'onde de la lumière incidente, la lumière diffusée à la même intensité quel que soit l'angle d'observation. Il suffit donc de mesurer I à un seul angle. Lorsque, d'autre part, les expériences sont effectuées à des concentrations faibles et des forces ioniques élevées, le terme d'interaction B devient négligeable.

La masse moléculaire est alors proportionnelle à $\frac{I}{c}$; l'utilisation d'une protéine étalon en permet la détermination directe :

$$M = M_{\text{et}} \frac{\left(\frac{I}{c}\right)}{\left(\frac{I}{c}\right)_{\text{et}}} \frac{\left(\frac{dn}{dc}\right)_{\text{et}}^2}{\left(\frac{dn}{dc}\right)^2}$$

Dans le cas où la solution étudiée contient un mélange de i molécules différentes, de concentrations c_i et de masses moléculaires M_i , la valeur de M obtenue par cette méthode représente une masse moléculaire moyenne en poids :

$$\overline{M}_w = \sum_i \frac{M_i c_i}{c_i}$$

Contrairement à tant d'autres méthodes, la diffusion de la lumière est donc une méthode qui permet la détermination en valeur absolue d'un paramètre physique d'une macromolécule, ici la masse moléculaire. Il est bien entendu qu'elle permet également et, par voie de conséquence, l'étude des variations de cette masse moléculaire sous l'influence de différents facteurs.

b. Ultracentrifugation analytique.

D'une manière très générale, la vitesse de sédimentation d'une molécule placée dans un champ de forces centrifuges est fonction des dimensions de cette molécule. L'ultracentrifugation est donc en principe une méthode de choix pour l'étude de la masse moléculaire et de la forme d'une protéine.

Au cours de notre travail cependant nous avons utilisé l'ultracentrifugation essentiellement comme critère d'homogénéité ou au contraire de polydispersité de la solution de trypsine étudiée. Nous ne nous étendons donc pas davantage sur les avantages ou les inconvénients de cette méthode.

II. ETUDE DE LA FIXATION DE LIGANDS PAR LA MOLECULE DE TRYPSINE.

1) Cas le plus simple.

La fixation d'une molécule de ligand L (proton, inhibiteur compétitif,...) par une molécule d'enzyme E peut être schématisée de la façon suivante :



L'équilibre (1) est caractérisé par les deux grandeurs suivantes :

- la constante de dissociation $K_{EL} = \frac{(E) (L_{total} - EL)}{(EL)}$

- la fraction de molécules d'enzyme ayant fixé une molécule de ligand

$$f_{EL} = \frac{(EL)}{(EL) + (E)} = \frac{1}{1 + \frac{(E)}{(EL)}} = \frac{1}{1 + \frac{K_{EL}}{(L_{total} - EL)}}$$

Lorsque la constante de dissociation est grande, on peut assimiler la concentration en ligand libre à la concentration en ligand total et écrire :

$$K_{EL} = \frac{(E) (L)}{(EL)} \quad \text{et} \quad f_{EL} = \frac{1}{1 + \frac{K_{EL}}{(L)}}$$

$f_{EL} = 1/2$ quand la concentration en ligand est égale à K_{EL} , c'est-à-dire quand $(L) = (L)_{1/2}$.

2) Cas complexe .

La fixation de plusieurs molécules de ligands $L_1, L_2, \dots, L_n$ par des molécules d'enzyme sous différentes formes $E_1, E_2, \dots, E_n$ est représentée par les schémas suivants :



.....



.....



.....

Les constantes de dissociation relatives à ces différents équilibres $K_{E_1 L_1}$, $K_{E_1 L_2}$, ... sont égales à $\frac{(E_1)(L_1)}{(E_1 L_1)}$, $\frac{(E_1)(L_2)}{(E_1 L_2)}$, ...; de même que précédemment on peut écrire les grandeurs suivantes,

$$f_{E_1 L_1} = \frac{(E_1 L_1)}{(E_1 L_1) + (E_1)} = \frac{1}{1 + \frac{(E_1)}{(E_1 L_1)}} = \frac{1}{1 + \frac{K_{E_1 L_1}}{(L_1)}}$$

$$f_{E_1 L_2} = \frac{(E_1 L_2)}{(E_1 L_2) + (E_1)} = \frac{1}{1 + \frac{(E_1)}{(E_1 L_2)}} = \frac{1}{1 + \frac{K_{E_1 L_2}}{(L_2)}}$$

L'étude de la fixation de ligands par la molécule de trypsine a été effectuée à l'aide de deux des techniques précédemment décrites, la polarimétrie et la spectrophotométrie d'absorption; la fixation de protons a été en outre étudiée directement par titrage potentiométrique.

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E S

1. MATERIEL .

Enzyme . La trypsine que nous avons utilisée est un produit Worthington, cristallisé deux fois en présence de MgSO_4 . Après dissolution des cristaux dans HCl N/100, on élimine complètement le sulfate de magnésium par dialyse contre le même solvant. On précipite ensuite des molécules dénaturées, insolubles en milieu NaCl molaire³³ ; on élimine enfin le sel par une nouvelle dialyse contre HCl N/100. Le produit commercial ainsi traité donne une préparation dont l'activité spécifique est augmentée et dont la lévoration est diminuée³⁴.

La concentration des solutions de trypsine est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 m μ , en utilisant comme coefficient d'extinction $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 16,1$. Cette valeur a été récemment confirmée³⁵ à partir de l'analyse des acides-aminés d'une solution de trypsine préparée dans les conditions exposées ci-dessus. Le coefficient d'extinction molaire correspondant ϵ_M est de 38.10^3 .

Inhibiteurs compétitifs . La butylamine^{11,36} et la benzylamine¹¹, redistillées avant usage, sont des produits Prolabo. La benzamidine¹², recristallisée dans un mélange éthanol-eau, est un produit Aldrich Chemical Co. La N- α -benzoyl-L-arginine (BA)^{11,36} et la proflavine³⁷ sont des produits Mann Research.

Les pK d'ionisation de la butylamine, de la benzylamine et de la benzamidine, déterminés à 10-15° par titrage potentiométrique, sont respectivement de 11,2, 9,9 et 11,8 . Le pK d'ionisation du carboxyle de la N- α -benzoyl-L-arginine déterminé par titrage polarimétrique est de 3.25^{réf.1}; le pK du groupement guanidyle est supérieur à 12. Enfin, le pK d'ionisation de la proflavine est égal à 9.65^{réf. 38}. Ces différentes valeurs de pK d'ionisation sont rassemblées sur le tableau 2 ; on a porté sur le même tableau les valeurs des constantes d'inhibition déterminées à pH neutre¹.

T A B L E A U 2

Constantes de dissociation des complexes trypsine-inhibiteur à pH neutre.
Valeurs des pK d'ionisation des inhibiteurs

Inhibiteur	K_i (M)	pK_b	pK_a
Butylamine	$1,6 \cdot 10^{-3}$	11,2	-
BA *	$8,0 \cdot 10^{-4}$	> 12	3,25
Benzylamine	$3,3 \cdot 10^{-4}$	9,9	-
Proflavine	$3,4 \cdot 10^{-5}$ (réf.39)	9,65	-
Benzamidine	$2,7 \cdot 10^{-5}$	11,8	-

* BA : N- α -benzoyl-L-arginine .

2. TECHNIQUES .

Polarimétrie .

Les mesures du pouvoir rotatoire de la trypsine à une longueur d'onde ($\lambda = 436$ ou $395 \text{ m}\mu$) ont été effectuées à l'aide d'un polarimètre électronique Quick Roussel-Jouan thermostatable. La valeur de l'angle de rotation α est obtenue directement en millidegrés sur l'échelle d'un galvanomètre devant lequel est placé un suiveur de spot Photodyne Sefram ; ce dispositif permet en particulier l'enregistrement des variations de α en fonction du temps. Les cuves utilisées ont des trajets optiques de 0,1, 0,2 et 0,5 dm. Les concentrations des solutions de trypsine sont comprises entre 1 et 5 mg/ml.

Les mesures du pouvoir rotatoire de la trypsine en présence d'un inhibiteur compétitif (ou éventuellement d'un substrat) ont été effectuées de trois façons différentes : a) Le mélange des réactifs, solution-mère de trypsine en HCl N/100 , inhibiteur compétitif ou substrat en milieu tamponné et salin, a lieu juste avant l'expérience ; la valeur du pouvoir rotatoire mesuré est comparée à celle d'une solution de trypsine témoin. La valeur du pH est déterminée avant et après la mesure du pouvoir rotatoire, à la température de l'expérience, c'est-à-dire à 10°. b) A un volume connu de trypsine, de pH donné, on ajoute à l'aide de micro-capillaires de capacité 5,10 et 20 μ l, des quantités croissantes d'une solution d'inhibiteur, amenée au même pH. Le pouvoir rotatoire du mélange est mesuré après chaque addition. c) On dispose bout à bout deux cuves polarimétriques contenant respectivement les solutions d'enzyme et de substrat et on mesure la somme du pouvoir rotatoire des solutions avant et après mélange du contenu des cuves.

La mesure des dispersions rotatoires de la trypsine a été effectuée successivement au moyen de différents spectropolarimètres. Nous avons d'abord utilisé un spectropolarimètre Rudolph 200S80Q qui permet de mesurer le pouvoir rotatoire à plusieurs longueurs d'onde entre 546 et 313 $m\mu$; la mise à notre disposition ultérieure des spectropolarimètres Cary 60 et Fica nous a permis par la suite d'enregistrer les courbes de dispersion rotatoire de la trypsine entre 550 et 210 $m\mu$. Les cuves utilisées, de trajets optiques de 0,01 à 1 dm, sont thermostatables ; selon la cuve employée et selon la zone de longueurs d'onde étudiée, les concentrations des solutions de protéine ont été comprises entre 0,1 et 5 mg/ml. Les résultats expérimentaux ont été analysés à l'aide des relations de Drude, de Moffitt et de Shechter-Blout (voir exposé des méthodes).

Spectrophotométrie d'absorption ultraviolette.

L'effet d'un paramètre quelconque (pH, température, inhibiteur,...) sur l'absorbance de la trypsine a été étudié par spectrophotométrie de différence à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau Cary 15.

Le titrage des tyrosines de la trypsine libre et du complexe trypsine-butylamine a été effectué par mesure de l'absorbance à 295 et 300m μ .

Les cuves utilisées ont un trajet optique de 1cm ; la concentration des solutions de protéine est de l'ordre de 1mg/ml. Le mélange des différents réactifs et la mesure du pH se font de la même façon que pour les mesures polarimétriques.

Diffusion de la lumière .

Les expériences de diffusion de la lumière ont été effectuées à l'aide d'un appareil construit au laboratoire ⁴⁰. La cellule de mesure de contenance minimale 1,7 ml, placée dans une cuve thermostatable, est traversée par un faisceau de lumière monochromatique ($\lambda = 436 \text{ m}\mu$) polarisée verticalement. L'intensité de la lumière diffusée par la solution est obtenue directement sur l'échelle d'un galvanomètre Sefram, devant lequel est disposé un suiveur de spot Sefram. La valeur de l'intensité diffusée est comparée à celle d'un étalon de verre, lui-même étalonné par rapport au benzène.

Le protocole expérimental est le suivant. Le tampon acétate de pH 4,8 est filtré sur millipore 0,22 μ directement dans la cellule de mesure ; son volume est déterminé par pesée. L'intensité I_s diffusée par ce solvant est mesurée. On ajoute alors dans le tampon à l'aide d'une pipette à striction une certaine quantité de solution-mère de trypsine en HCl N/100 ; cette solution-mère a été préalablement centrifugée pendant 45 mn à 40 000 tours/mn. L'intensité I_{sol} diffusée par la solution est enregistrée en fonction du temps. A tout instant, l'intensité I diffusée par la protéine est égale à $I = I_{sol} - I_s$. Après un temps donné, on ajoute soit de l'acide chlorhydrique N, soit de la butylamine 5 M, ces

deux solutions ayant été préalablement filtrées sur millipore. Dans certaines expériences, l'addition de la butylamine dans la solution tampon est antérieure à celle de la trypsine.

Ultracentrifugation analytique.

Les ultracentrifugations analytiques ont été effectuées au moyen d'une ultracentrifugeuse Beckman. La vitesse du rotor est de 67 770 tours/mn. Les types d'expérience sont analogues aux précédents. A une solution de tampon acétate ou de tampon acétate + butylamine, on ajoute une quantité donnée de solution-mère de trypsine en HCl N/100 et on effectue aussitôt la centrifugation ; l'intervalle de temps qui sépare le moment où on effectue le mélange et celui où on fait la première photographie est de l'ordre d'une heure. Dans d'autres cas, on laisse d'abord incubé pendant une heure la trypsine en tampon acétate ; on ajoute ensuite de la butylamine et on effectue seulement alors la centrifugation.

Potentiométrie.

Le pH des solutions est mesuré au moyen d'un pH-mètre Radiometer type 4B, muni d'une électrode de verre G222 B.

Le titrage des protons libérés ou absorbés par l'enzyme lors de l'association de la trypsine et d'un inhibiteur compétitif ou d'un substrat a été effectué à l'aide d'un pH-mètre Vibron EIL. A une solution non tamponnée de trypsine de pH donné, on ajoute une solution d'inhibiteur (ou de substrat) amenée au même pH ; le titrage du nombre de protons libérés ou absorbés par molécule d'enzyme se fait à l'aide de NaOH ou de HCl N/100. La concentration des solutions de trypsine est comprise entre 0,1 et 0,2 mM.

L'étude de l'inhibition de l'hydrolyse du N- α -acétyl-L-phénylalanine méthyl ester (APheMe) par la N- α -benzoyl-L-arginine et par la benzamidine a été effectuée par titrage potentiométrique à pH constant, à l'aide du pH-mètre Vibron EIL.

R E S U L T A T S

PREMIERE PARTIE . ETUDE DE LA CONFORMATION ET DES CHANGEMENTS DE CONFORMATION DE LA TRYPSINE LIBRE .

A. Effet du pH sur la structure de la trypsine entre pH 1,2 et 13.

L'optimum d'activité catalytique de la trypsine se situe aux pH neutres et légèrement alcalins, entre pH 7,5 et 9. Afin de déterminer *si* les variations d'activité en fonction du pH sont liées à des modifications parallèles de la structure de la protéine, nous avons étudié les propriétés rotatoires et spectrales de la trypsine entre pH 1,2 et 13.

I. Propriétés rotatoires.

L'étude des propriétés rotatoires de la trypsine a été effectuée en milieu tamponné à 10° et à μ 0,4. Ces conditions expérimentales ont été choisies parce que, à cette température et pour cette force ionique, l'autolyse que subit l'enzyme dans la zone de pH d'activité catalytique est considérablement diminuée.

1. Variation du pouvoir rotatoire spécifique en fonction du pH.

Nous avons étudié l'effet du pH sur la valeur du pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine à 436 m μ , entre pH 1,5 et 13. La courbe de variation de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH est représentée sur la figure 1 ^{réf. 41}. Les variations de $[\alpha]$ sont totalement réversibles entre pH 1,5 et 11 et deviennent irréversibles au-delà de pH 11. On distingue essentiellement quatre zones en fonction du pH : entre pH 5 et 8,5, la rotation spécifique est constante et minimale en valeur absolue : $[\alpha] = -70^\circ$. Aux pH inférieurs à 5, la lévoration augmente

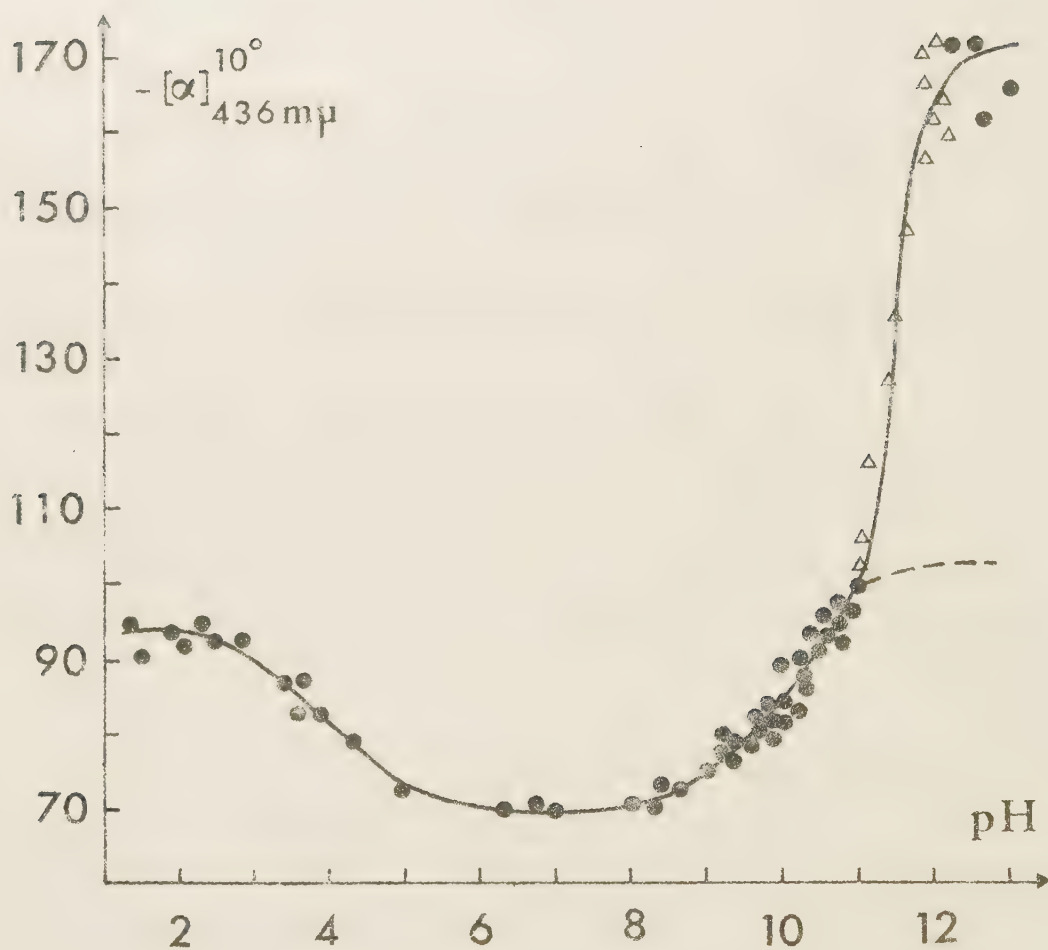


FIGURE 1 : Variation du PR spécifique de la trypsine en fonction du pH.

● valeurs constantes en fonction du temps.

Δ valeurs constantes, obtenues au bout de 20 à 60 mn.

Conditions d'expérience : $\theta = 10^\circ$ - $\mu = 0,4$ - (trypsine) = 1 à 5 mg/ml
trajet optique $d = 0,1$ à $0,5$ dm.

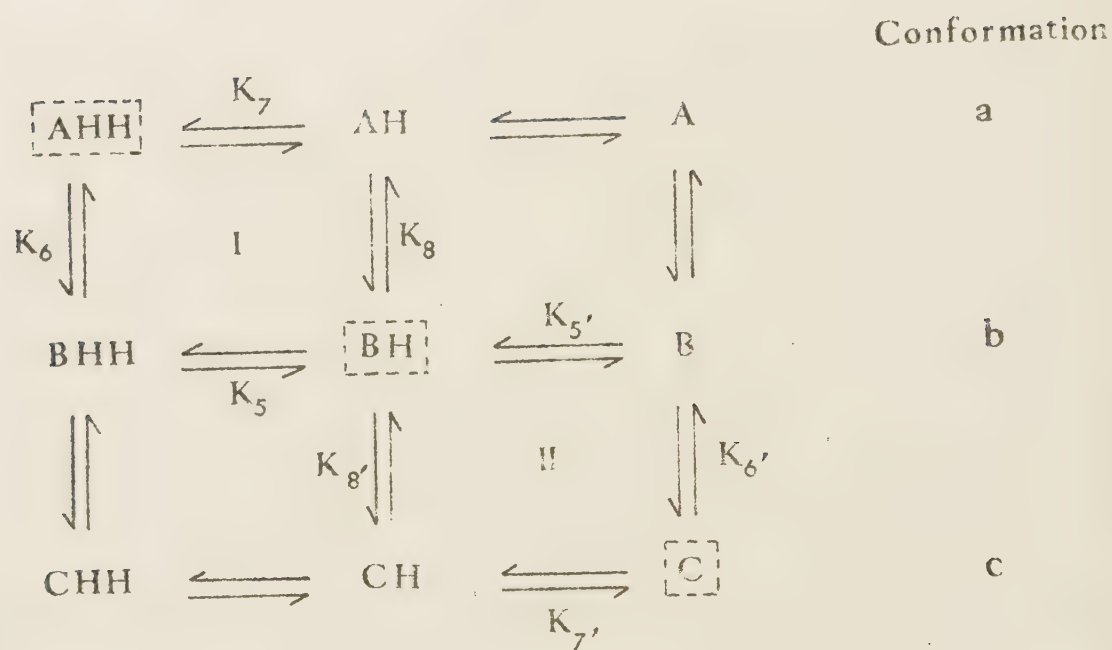
jusqu'à une valeur limite de -94° obtenue dès pH 2,5. Entre pH 8,5 et 11, la lévoration augmente également jusqu'à une valeur limite qu'on ne peut obtenir que par extrapolation et qui est de l'ordre de -102° . Enfin, au-delà de pH 11, la rotation varie en fonction du temps et atteint une valeur finale de -170° environ aux pH supérieurs à 12,5.

Cette variation de $[\alpha]_{436}$ en fonction du pH a été observée pour des concentrations en trypsine comprises entre 2 et 5 mg/ml. Les effets de la température et de la concentration en protéine sur le pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine seront décrits ultérieurement en détail pour quelques valeurs du pH. Remarquons simplement que la valeur de $[\alpha]$ n'est pas modifiée par chauffage de la solution de 10 à 20° à des pH compris entre 2 et 3. Nous verrons d'autre part que, à pH 2,1 comme à pH 4,8, le pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine est indépendant de la concentration entre 0,1 et 10 mg de protéine par ml. Enfin, à pH 2,5, la valeur de $[\alpha]$ est insensible à une modification de la force ionique du milieu, entre μ 0,003 et 0,7.

Nous allons examiner successivement les variations de $[\alpha]$ en fonction du pH entre pH 1,5 et 11 d'une part et aux pH supérieurs à 11 d'autre part.

a. Variations réversibles de $[\alpha]$ entre pH 1,5 et 11.

Les variations réversibles de $[\alpha]$ entre pH 7 et 1,5 d'une part et entre pH 7 et 11 d'autre part, ont une allure sigmoïde (fig.1). Les représentations logarithmiques de ces variations en fonction du pH sont des droites ; les points de demi-transition sont situés à pH 3,7 en milieu acide et à pH 10,1 en milieu alcalin. Les changements de conformation réversibles que subit la protéine de part et d'autre de la neutralité semblent donc liés à la protonation de deux groupements ionisables de la molécule de pK apparents respectivement 3,7 et 10,1.



S C H E M A 1

Les équilibres correspondant à ces différentes formes moléculaires de trypsine peuvent être représentés par le schéma 1. Dans le schéma 1, les trois lettres A,B et C représentent la molécule sous trois conformations différentes que nous désignerons par "a", "b" et "c". La lettre H correspond aux groupements ionisables de pK apparents 3,7 et 10,1 cités ci-dessus : les deux groupes sont protonés dans les molécules AHH,BHH et CHH ; seul le groupe de pK apparent 10,1 est protoné dans les molécules AH, BH et CH ; enfin les deux groupes sont déprotonés dans les molécules A,B et C. Etant donné l'écart qui sépare les valeurs de ces deux pK, il est clair que les molécules A et CHH sont en fait en proportion tout à fait négligeable ; il suffit donc de considérer les équilibres thermodynamiques I et II correspondant respectivement aux résultats expérimentaux obtenus aux pH inférieurs à 7 et supérieurs à 7.

Les constantes d'ionisation relatives à ces équilibres sont égales à :

$$K_5 = \frac{(BH)(H)}{(BHH)}, \quad K_7 = \frac{(AH)(H)}{(AHH)}, \quad K_{5'} = \frac{(B)(H)}{(BH)}, \quad K_{7'} = \frac{(C)(H)}{(CH)}.$$

Les constantes de transformation sont égales à :

$$K_6 = \frac{(BHH)}{(AHH)}, \quad K_8 = \frac{(BH)}{(AH)}, \quad K_{6'} = \frac{(B)}{(C)}, \quad K_{8'} = \frac{(BH)}{(CH)}.$$

Les molécules de trypsine sous forme "b" étant choisies comme référence, la fraction f_t de protéine transformée, c'est-à-dire la fraction de molécules sous formes "a" ou "c", est égale à :

$$f_t = \frac{(a) + (c)}{(a)+(c)+(b)} = \frac{(AHH) + (AH) + (CH) + (C)}{(AHH)+(AH)+(CH)+(C)+(BHH)+(BH)+(B)}$$

ou

$$f_t = \frac{1}{1 + \frac{(H)}{K_5} + \frac{K_{5'}}{(H)}} = \frac{1}{1 + \frac{(H)}{K_7 K_8} + \frac{1}{K_8} + \frac{1}{K_{8'}} + \frac{K_{5'}}{(H) K_{6'}}}$$

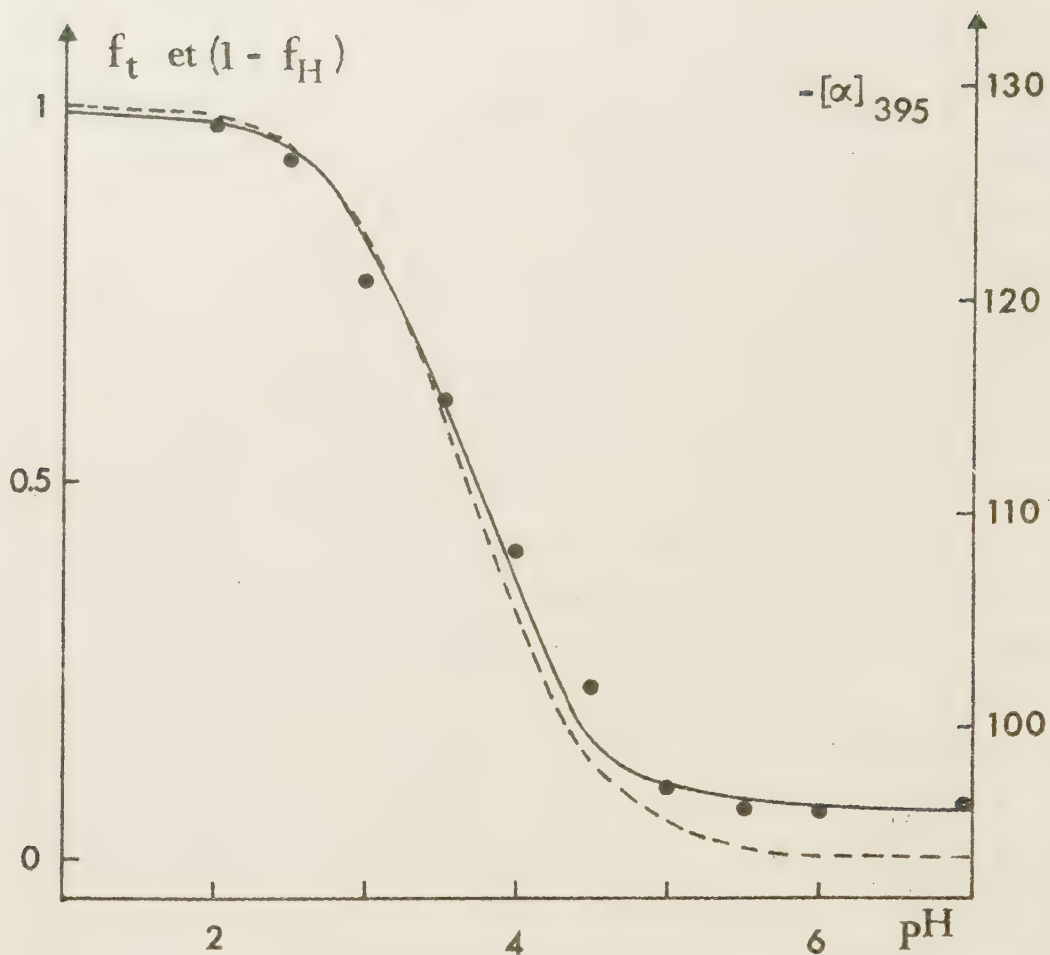


FIGURE 2 : Valeurs expérimentales du PR spécifique de la trypsine entre pH 2 et 7 : • . Les conditions d'expérience sont les mêmes que celles indiquées figure 1 . Les courbes en tracé plein et en tirets sont théoriques ; elles représentent respectivement la variation en fonction du pH de la fraction f_t (—) de protéine transformée et de la fraction $(1 - f_H)$ (----) de protéine protonée (voir explication dans le texte).

Les valeurs de ces différentes constantes ne sont pas accessibles expérimentalement. Il est cependant légitime de supposer que les molécules AHH, BH et C sont les trois formes prépondérantes de la trypsine, c'est-à-dire de supposer d'une part que K_6 et $K_{6'}$ ont des valeurs faibles devant 1, d'autre part que K_8 et $K_{8'}$ ont des valeurs fortes devant 1. On peut alors écrire les relations suivantes dans lesquelles $K_{I \text{ app.}}$ et $K_{II \text{ app.}}$ représentent respectivement les constantes apparentes d'ionisation des groupements responsables des transconformations acide et alcaline réversibles de l'enzyme :

$$K_{I \text{ app.}} = K_7 K_8 = K_5 K_6$$

$$\text{sachant que } K_{I \text{ app.}} = 10^{-3,7} = 2 \cdot 10^{-4}$$

$$\text{et } K_{II \text{ app.}} \approx K_5 K_{8'} = K_7 K_{6'}$$

$$\text{sachant que } K_{II \text{ app.}} = 10^{-10,1} = 8 \cdot 10^{-11}.$$

Les courbes de variation de f_t en fonction du pH, qui rendent le mieux compte des résultats expérimentaux de variation du pouvoir rotatoire sont représentées sur les figures 2 et 3 ; l'allure de ces courbes a été déterminée par le calcul en utilisant les valeurs suivantes des constantes :

$$K_7 = 10^{-5} \quad (pK_7 = 5)$$

$$K_{7'} = 5 \cdot 10^{-9} \quad (pK_{7'} = 8,3)$$

$$K_8 = 2 \cdot 10^1$$

$$K_{6'} = 1,6 \cdot 10^{-2}$$

$$K_5 = 2 \cdot 10^{-2} \quad (pK_5 = 1,7)$$

$$K_{5'} = 1,6 \cdot 10^{-12} \quad (pK_{5'} = 11,8)$$

$$K_6 = 10^{-2}$$

$$K_{8'} = 5 \cdot 10^1$$

Les valeurs de ces constantes, choisies pour rendre compte des données expérimentales, sont plausibles. En effet, en milieu acide, le groupement dont la protonation provoque un changement de conformation de la protéine est sans doute le carboxyle β ou γ d'un résidu aspartique ou

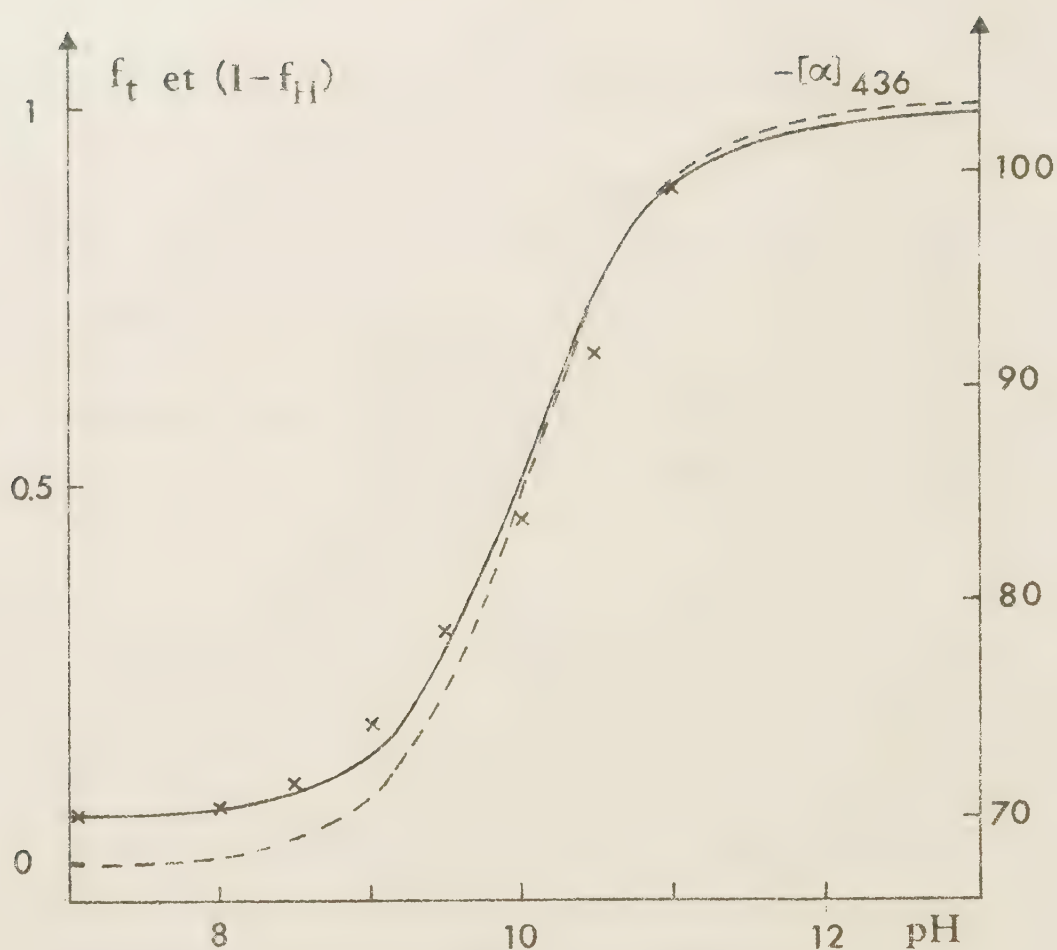


FIGURE 3 : Valeurs expérimentales du PR spécifique de la trypsine entre pH 7 et 11 : x . Les conditions d'expérience sont les mêmes que celles indiquées dans la figure 1 . Les courbes en tracé plein et en tirets sont théoriques ; elles représentent respectivement la variation en fonction du pH de la fraction f_t (—) de protéine transformée et de la fraction $(1 - f_H)$ (---) de protéine non protonée (voir explications dans le texte).

glutamique. Dans les formes transformées de l'enzyme (formes "a"), le pK de ce carboxyle doit être normal ; on peut lui attribuer une valeur de 5 environ, correspondant à une valeur de K_7 de 10^{-5} . A partir de la relation, $K_7 K_8 = 2.10^{-4}$, on déduit une valeur de 2.10^1 pour K_8 . La valeur de 1,7 que nous avons donnée au pK du carboxyle dans les molécules non transformées de l'enzyme (formes "b") n'est qu'indicative. Il est évident que la précision expérimentale n'est pas suffisante pour qu'une courbe théorique unique corresponde aux résultats obtenus. Il est cependant clair que dans les formes "b", le carboxyle en question a un pK d'ionisation anormalement bas ; au pK de 1,7 correspondent des valeurs de K_5 de 2.10^{-2} et de K_6 de 10^{-2} .

D'après cette représentation, il y aurait 94 % de molécules sous la forme "b" (BHH, BH et B) à pH 7 et 97 % sous la forme "a" (AHH et AH) à pH 2. On peut alors calculer les valeurs du pouvoir rotatoire spécifique des formes "a" et "b" : $[\alpha]_{395}^b = -94^\circ$ et $[\alpha]_{395}^a = -129^\circ$. Le même calcul peut être fait pour les valeurs de $[\alpha]_{436 \text{ m}\mu}$: $[\alpha]_{436}^b = -68^\circ$ et $[\alpha]_{436}^a = -95^\circ$.

En milieu alcalin, les valeurs que nous avons adoptées pour les constantes d'ionisation du groupement responsable de la transformation alcaline, correspondent à un pK normal de 8,3 dans les molécules transformées (formes "c") et à un pK de 11,8 dans les molécules non transformées (formes "b"). Les valeurs de K_8 et de K_6 sont égales respectivement à 5.10^1 et à $1,6.10^{-2}$. D'après ces valeurs, il y aurait 94 % de formes "b" (BHH, BH et B) à pH 7 et 90 % de formes "c" (CH et C) à pH 11. On peut alors calculer le pouvoir rotatoire spécifique de la forme "c" $[\alpha]_{436}^c = -103^\circ$.

D'autre part, la variation en fonction du pH de la fraction f_H de molécules de trypsine sous forme AH, BH et CH est donnée par la relation suivante :

$$f_H = \frac{(AH) + (BH) + (CH)}{(AH) + (BH) + (CH) + (AHH) + (BHH) + (B) + (C)}$$

ou

$$f_H = \frac{1}{1 + \frac{\frac{(H)}{K_7 K_8} + \frac{(H)}{K_5} + \frac{K_{5'}}{(H)} + \frac{K_{5'}}{K_{6'}(H)}}{1 + \frac{1}{K_8} + \frac{1}{K_{8'}}}}$$

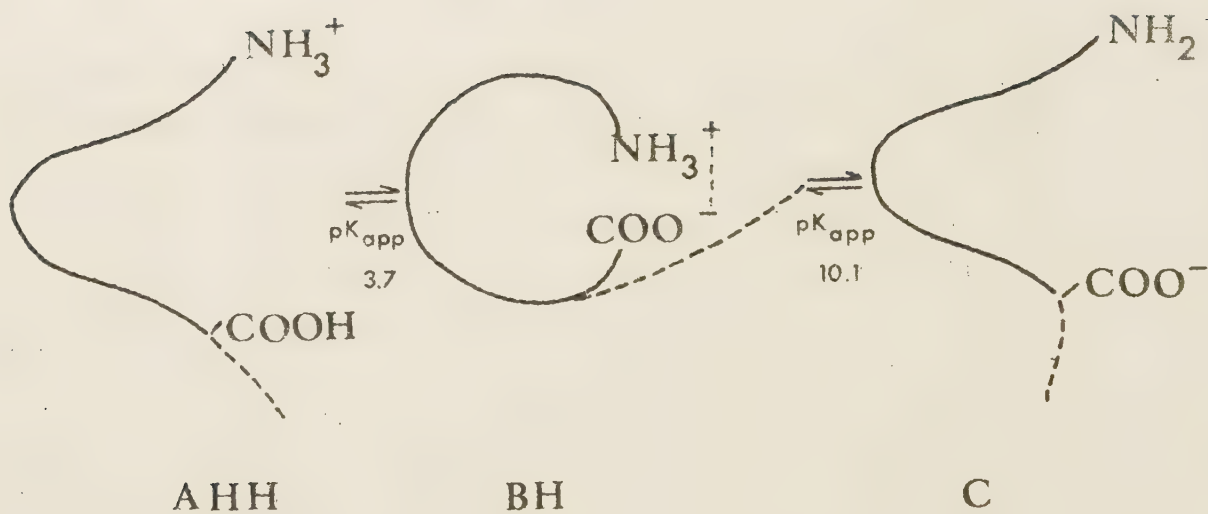
La courbe calculée de variation en fonction du pH de la fraction $(1-f_H)$ de molécules de trypsine dont les deux groupements spécifiques sont protonés (formes AHH et BHH) est représentée sur la figure 2 ; celle de la fraction de molécules de trypsine dont les groupements sont déprotonés (formes B et C) est représentée sur la figure 3.

D'après les courbes calculées de variation de $(1-f_H)$ en fonction du pH, il y aurait à pH 7, 100 % de molécules de trypsine sous forme AH, BH et CH, la forme BH en représentant 94 %.

Comme nous l'avons dit plus haut, toutes ces valeurs ne peuvent être qu'un ordre de grandeur. Il est évident en effet que le schéma 1 est extrêmement simplifié ; on n'y tient pas compte en particulier des modifications importantes de la charge globale de la protéine entre pH 2 et 11 (point isoélectrique = 10,8 réf.42).

L'analyse de la variation du pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine en fonction du pH permet cependant de mettre en évidence la prépondérance de trois formes moléculaires de trypsine, distinctes par leurs propriétés rotatoires. A pH acide existe essentiellement la forme AHH ($[\alpha]_{436} = -95^\circ$), à pH neutre, la forme BH ($[\alpha]_{436} = -68^\circ$) et à pH alcalin, la forme C ($[\alpha]_{436} = -103^\circ$).

Les entités moléculaires AHH et C n'ont pas exactement le même pouvoir rotatoire. Cependant, la variation de $[\alpha]$ en fonction du pH (fig.1) présente une certaine symétrie et il est tentant de supposer que la transformation de BH en AHH ou en C, respectivement par protonation du carboxyle de pK apparent 3,7 et par déprotonation du groupement



S C H E M A 2

de pK apparent 10,1 a lieu selon un schéma analogue au schéma 2.

La nature du résidu de pK apparent 10,1 n'est pas connue. Il pourrait s'agir, par analogie avec la chymotrypsine⁴³, du groupement $\alpha\text{-NH}_3^+$ de l'isoleucine N terminal de la chaîne polypeptidique. Une liaison électrostatique entre la charge positive de cet acide-aminé et la charge négative d'un carboxyle ionisé rendrait compte de la valeur "anormale" des pK d'ionisation de ces deux groupes dans les formes "b" ; elle maintiendrait une certaine portion de la chaîne protéique dans une conformation favorable à la fixation du substrat par l'enzyme. La rupture de cette liaison provoquée par abaissement ou par augmentation du pH conduirait au déploiement de cette portion de chaîne, et donc à une augmentation de la lévoration.

La différence de pouvoir rotatoire qui existe entre les formes AHH et C, faible en comparaison de celle qui existe avec la forme BH, pourrait être attribuée à une différence de conformation du reste de la chaîne protéique. Nous allons voir, en effet, que bien que AHH et C aient subi une certaine "dénaturation" par rapport à BH, ces formes possèdent encore une structure extrêmement compacte qu'on ne peut confondre avec celle d'une protéine totalement déployée. Le reste de la molécule, en raison en particulier des charges globales inégales des formes AHH ($Z = +20$) et C ($Z \leq 0$), peut présenter une certaine différence de conformation provoquant ainsi la différence de pouvoir rotatoire observée.

b. Variations irréversibles de $[\alpha]$ aux pH supérieurs à 11.

Aux pH supérieurs à 11, on constate que la lévoration spécifique de la trypsine augmente en fonction du temps et d'autant plus rapidement que le pH est élevé ; les cinétiques obtenues à quelques valeurs de pH sont représentées sur la figure 4. La variation de $[\alpha]$ n'est pas due à l'autolyse de l'enzyme - celle-ci est nulle dans les conditions expérimentales utilisées ($\mu = 0,4$ et $\Theta = 10^\circ$) - mais à une dénaturation de la protéine. Le phénomène est extrêmement important

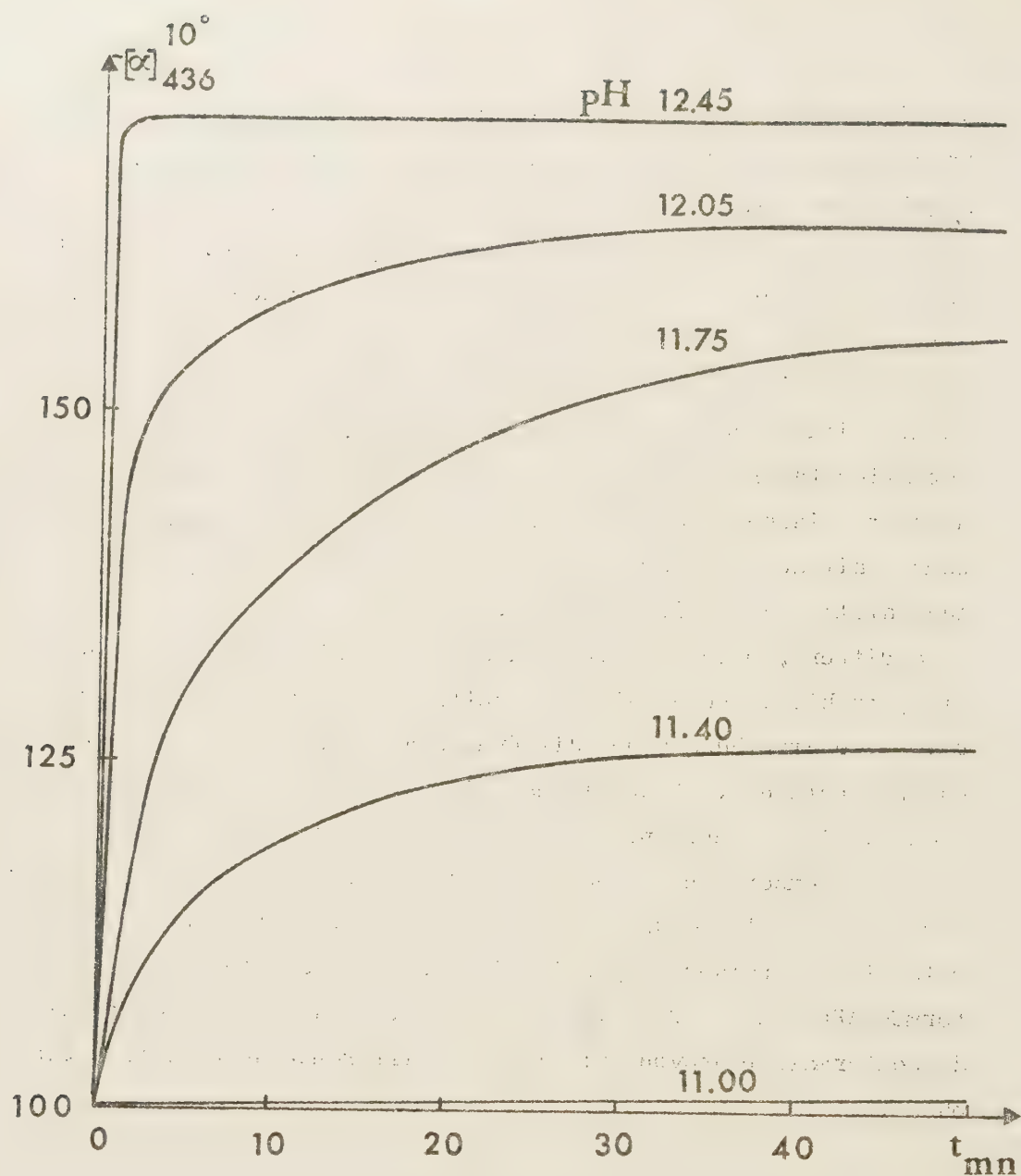


FIGURE 4: Cinétiques de variation du PR spécifique de la trypsine à différentes valeurs de pH. Les conditions d'expérience sont les mêmes que celles indiquées figure 1.

puisque le pouvoir rotatoire de la protéine à pH 12,5 est environ deux fois et demi celui de la protéine sous forme BH à pH 7 ; sa valeur est voisine de celle du pouvoir rotatoire des produits d'autolyse de la trypsine ou de celle du pouvoir rotatoire de la trypsine en solution dans du chlorure de guanidium 6 M.

La variation du pouvoir rotatoire est partiellement réversible entre pH 11 et 12; par acidification de la solution jusqu'à pH 7, on obtient une valeur de $[\alpha]$ intermédiaire entre la valeur initiale et celle caractéristique de la protéine à pH neutre.

Après passage aux pH supérieurs à 12, l'acidification de la solution provoque une précipitation irréversible de la protéine à pH 9. On observe d'autre part que le chauffage d'une solution de trypsine à pH 12,5 s'accompagne d'une diminution irréversible de la lévoration : on obtient une relation linéaire entre la variation de $[\alpha]$ et la variation de la température entre 10 et 50°.

Considérons tout d'abord les résultats obtenus entre pH 11 et 12. Dans cette zone de pH, la variation du pouvoir rotatoire de la trypsine en fonction du temps obéit à une succession de cinétiques du premier ordre. Ce phénomène est à rapprocher de celui observé par Lazdunski et Delaage⁴⁴; ces auteurs ont mis en évidence par spectrophotométrie que le démasquage des tyrosines anormales de la protéine se faisait par une suite de réactions d'ordre un. Il semble donc que le changement de conformation de la trypsine observé par polarimétrie soit relié à l'ionisation des tyrosines de pK anormalement élevé. Riordan et al.⁴⁵ ont également suggéré la participation de tyrosines masquées au maintien de la structure de la molécule de trypsine, en montrant que l'acétylation dans l'urée 8 M de ces résidus de tyrosine entraînait l'inactivation irréversible de l'enzyme. Les quatorze lysines de la molécule étant situées à la surface de la protéine⁶, les seuls autres acides-aminés, dont l'ionisation pourrait provoquer un changement de structure de la trypsine au-delà de pH 11, sont les deux arginines ; la valeur du pK de ces acides-aminés étant supérieure

à 12, la contribution de l'ionisation des arginines à la dénaturation de la protéine n'est pas vraisemblable.

Nous avons vu en second lieu qu'aux pH supérieurs à 12,5, la trypsine était dénaturée irréversiblement et précipitait lors de l'acidification de la solution : ces phénomènes sont dûs vraisemblablement à l'hydrolyse en milieu alcalin par les ions OH^- , des ponts disulfures et à leur recombinaison désordonnée lors de l'acidification. Un argument en faveur de cette interprétation est que la lévoration de la protéine diminue en fonction du temps d'une part, et lors de l'élévation de la température d'autre part. Or, Würz et Haurowitz⁴⁶ ont montré que le pouvoir rotatoire des cystéines était plus faible en valeur absolue que celui des cystines ; l'hydrolyse des ponts disulfures doit donc s'accompagner d'une diminution de la lévoration. L'hydrolyse alcaline des ponts disulfures des protéines a été également observée par spectrophotométrie, dans le cas par exemple de la ribonucléase⁴⁷ ou de l'ovomucoïde⁴⁸. Enfin, Lazdunski et Delaage⁴⁹ ont mis en évidence qu'un échantillon de trypsinogène irréversiblement dénaturé en milieu alcalin avait perdu environ 17 % de son contenu en cystine.

2. Dispersions rotatoires entre 550 et 210 m μ .

L'étude de l'effet du pH sur la valeur du pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine nous permet donc de distinguer très schématiquement quatre formes principales sous lesquelles peut se trouver la protéine. Ce sont les formes AHH, prédominante à pH 2, BH, prédominante à pH 7, C, prédominante à pH 11 et enfin la protéine dénaturée irréversiblement en milieu alcalin à pH 13. Il était intéressant d'essayer de mieux caractériser ces différentes formes par une étude plus détaillée de leurs propriétés rotatoires^{50,51}. Nous avons donc effectué des mesures de dispersion rotatoire de solutions de trypsine entre pH 2 et 13. Pour des raisons maintenant bien établies et que nous discuterons rapidement un peu plus loin, la dispersion rotatoire d'une protéine globulaire n'apporte pas sur la structure secondaire de cette protéine autant de renseignements qu'on l'avait espéré.

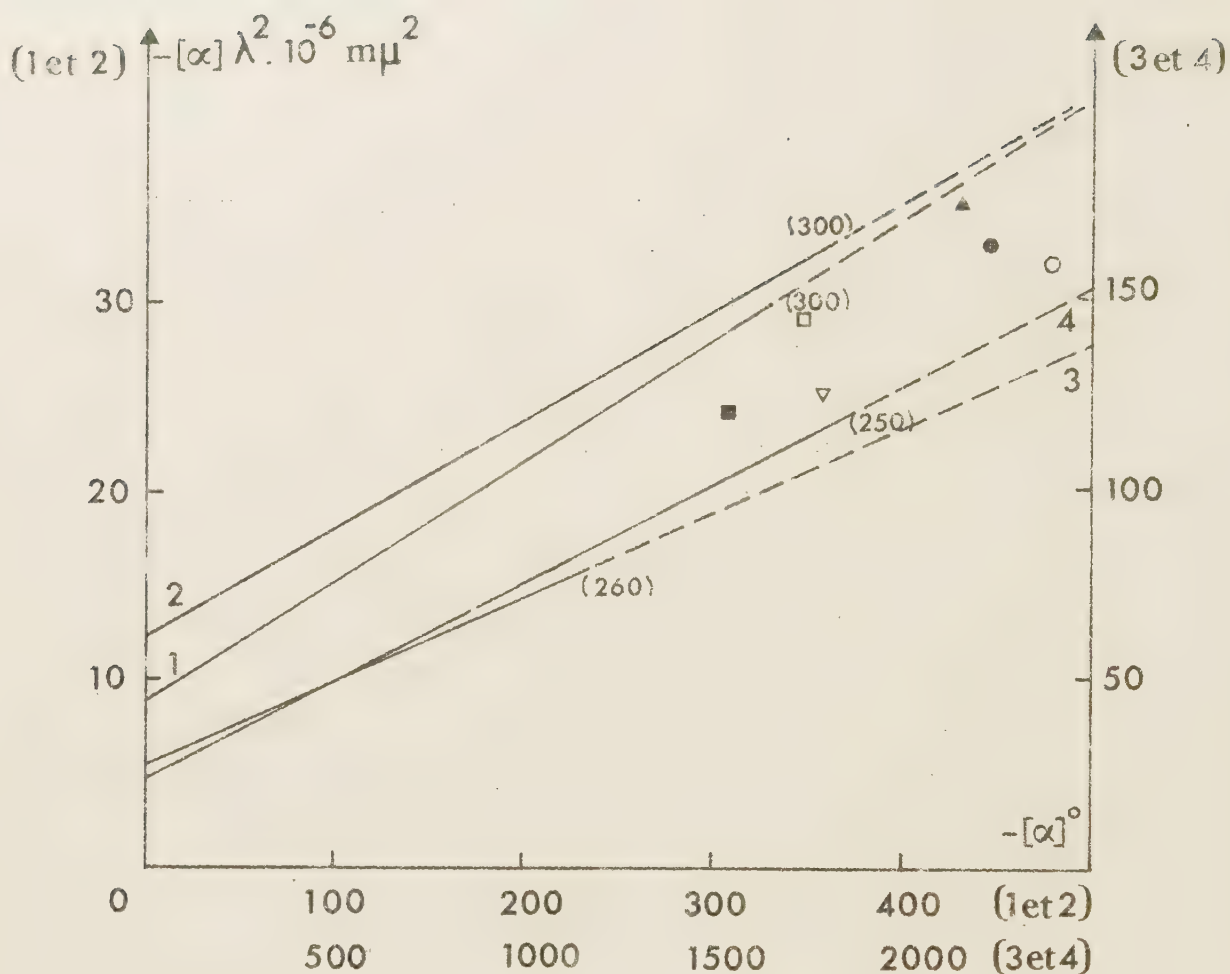


FIGURE 5 : D.O.R. de solutions de trypsine. Représentation de Drude : $[\alpha]\lambda^2 = A + [\alpha]\lambda_c^2$. A est donné par l'ordonnée à l'origine et λ_c^2 par la pente des droites. Les valeurs indiquées à la jonction des droites en trait plein et en tirets sont celles des longueurs d'onde au-delà desquelles la loi de Drude n'est plus obéie. Les symboles représentent des mesures expérimentales aux longueurs d'onde indiquées ci-après.

- Courbe 1 : pH 7 - $\theta = 10^\circ$ λ : $\square$ 290, $\blacksquare$ 280, ∇ 270, $\circ$ 260.
 2 : pH 2 - $\theta = 10^\circ$ λ : $\blacktriangle$ 290, $\bullet$ 280.
 3 : pH 12,9 - $\theta = 10^\circ$
 4 : pH 2,2 - $\theta = 55^\circ$.

Nous ne donnerons donc ici que l'essentiel des résultats obtenus.

a. Dispersion rotatoire entre 550 et 250 m μ .

La courbe de dispersion rotatoire de la forme BH (pH 5 à 8,5) présente, entre 300 et 250 m μ , dans la zone d'absorption des chromophores aromatiques et des ponts disulfures, de nombreux effets Cotton ; leur amplitude est d'environ 130° (fig.5, courbe 1). Il est raisonnable d'attribuer l'existence de ces effets Cotton à l'absorbance des résidus masqués à l'intérieur de la protéine ; la valeur du pouvoir rotatoire [R'] ramené à un de ces résidus est de l'ordre de 2 000°. Cette rotation est bien plus importante que celle des mêmes acides-aminés libres ⁵².

L'amplitude des effets Cotton diminue lorsqu'on abaisse le pH au-dessous de pH 5 et qu'on l'augmente au-dessus de pH 8,5; cependant, les dispersions rotatoires des formes AHH et C présentent encore des effets Cotton dans cette zone de longueurs d'onde. Par contre, la courbe de dispersion de la protéine dénaturée irréversiblement est monotone jusqu'à 250 m μ (fig.5, courbes 2 et 3).

Les "anomalies" de la dispersion rotatoire de la trypsine entre pH 2 et 11 sont mises en évidence par la représentation de Drude à un terme (fig. 6). Les dispersions rotatoires des formes BH (courbe 1) et AHH (courbe 2), de même que celle de C, n'obéissent à l'équation de Drude que jusqu'à 300 m μ ; au-delà de cette longueur d'onde, les points expérimentaux s'écartent d'autant plus de la droite que les effets Cotton entre 300 et 250 m μ sont plus importants. Au contraire, la dispersion rotatoire de la protéine à pH 12,9 obéit à l'équation de Drude jusqu'à 260 m μ (fig.6, courbe 3). Celle de la protéine dénaturée réversiblement par chauffage à pH 2,2 est indiquée sur la même figure (courbe 4) ; la dispersion rotatoire est également monotone et obéit à l'équation de Drude jusqu'à 250 m μ .

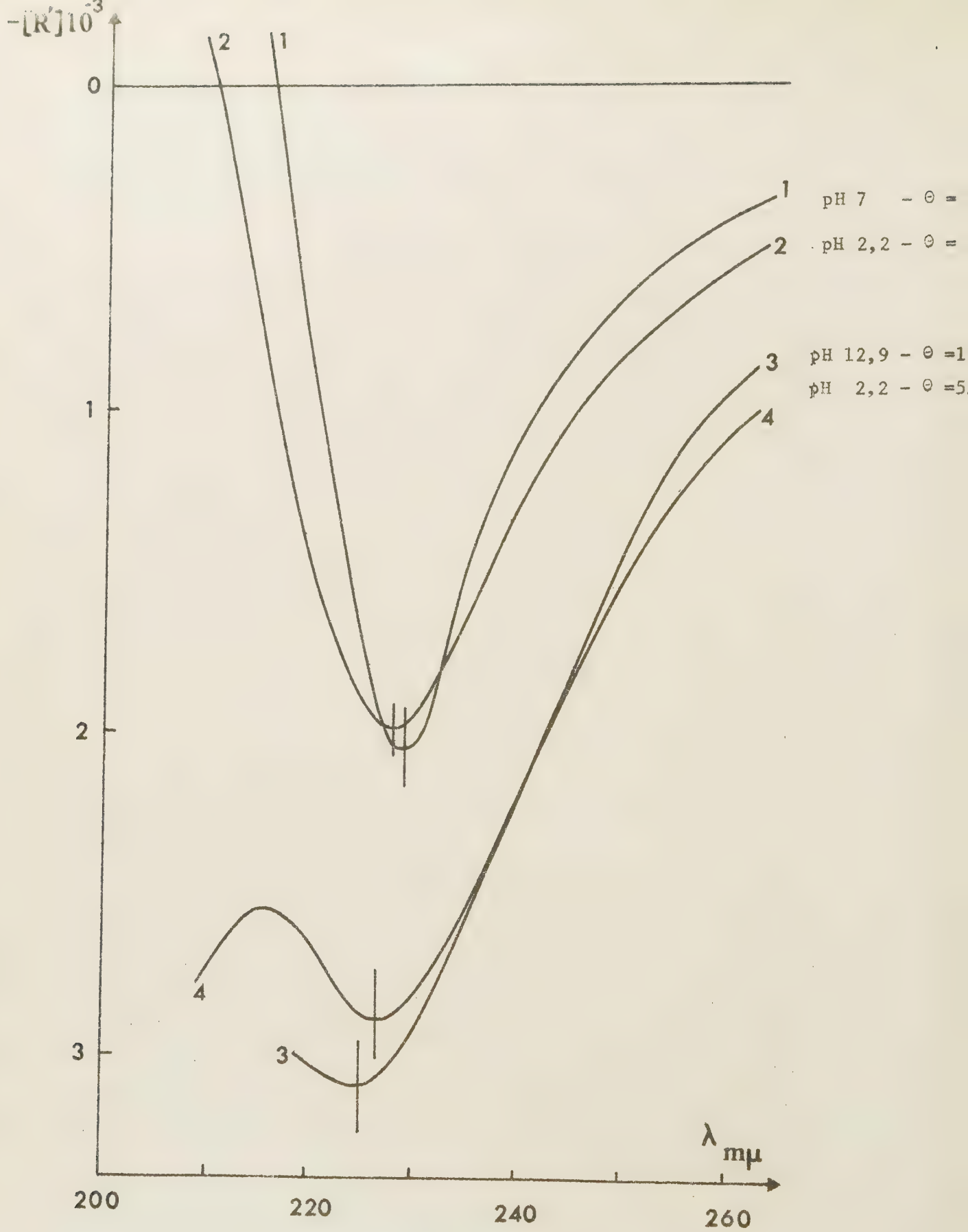


FIGURE 7 : Dispersions rotatoires de solutions de trypsine.

L'effet du pH, entre pH 2 et 13, sur la valeur des différents paramètres de Drude, Moffitt et Shechter-Blout, a été étudié. Nous n'avons indiqué sur le tableau 3 (p.29) que les valeurs caractéristiques des formes BH et AHH et des formes dénaturées en milieu alcalin ou à haute température. Entre pH 2 et 11, la valeur de b_0 est faible et constante ; il s'ensuit que les valeurs de a_0 et de A , faibles également en grandeur absolue, suivent la même variation en fonction du pH que celle de $[\alpha]$ (cf.fig.1). Les valeurs de A_{225} et de A_{193} sont approximativement constantes en fonction du pH ; celles de λ_c présentent un maximum au voisinage de la neutralité. Les proportions en hélice α de la protéine calculées à partir de ces différentes valeurs ne sont pas les mêmes selon le paramètre utilisé. L'accord n'est satisfaisant que dans les cas où la protéine est dénaturée.

b. Dispersion rotatoire entre 250 et 210 m μ .

Les effets Cotton de la trypsine en solution à des pH situés entre 2 et 11 présentent des caractères tout à fait particuliers (fig.7) ; sur le tableau 3 sont indiquées les longueurs d'onde $\lambda_{\min}$ auxquelles on observe le premier minimum d'effet Cotton, les valeurs de $[R']_{\min}$ correspondantes et les longueurs d'onde $\lambda_{\alpha=0}$ où le pouvoir rotatoire s'annule.

Si nous comparons la dispersion rotatoire de la trypsine à pH 2 aux dispersions rotatoires de l'hélice α , de la pelote statistique et de la structure β de polypeptides synthétiques (fig.8b), nous voyons immédiatement qu'il est impossible de retrouver la dispersion rotatoire de la trypsine à partir de proportions variables des trois structures modèles, puisque à 228 m μ , minimum de l'effet Cotton, le pouvoir rotatoire de la protéine est inférieur en valeur absolue à celui de l'hélice, de la pelote ou de la structure β . Les courbes de dichroïsme circulaire (fig.8 a) conduisent aux mêmes conclusions. La dispersion rotatoire de la trypsine à pH 7, bien que légèrement différente de celle de la trypsine à pH 2, n'est pas davantage interprétable par la présence d'un

T A B L E A U 3

Caractéristiques rotatoires de la trypsine .

Paramètres rotatoires	pH 7 - $\theta = 10^\circ$ (BH)	pH 2,2 - $\theta = 10^\circ$ (AHH)	pH 12,9 - $\theta = 10^\circ$	pH 2,2 - $\theta = 55^\circ$ (DHH)
$A \cdot 10^{-6} \text{ m}\mu^2$	$9,6 \pm 0,5$	$12,5 \pm 0,7$	$28,4 \pm 0,5$	25 ± 1
$\lambda_c \text{ m}\mu$	247 ± 8	236 ± 5	210 ± 7	225 ± 5
a_o	170 ± 30	230 ± 20	515 ± 20	500 ± 50
b_o	85 ± 30	70 ± 30	0	55 ± 30
A_{225}	375 ± 100	400 ± 100	250 ± 60	400 ± 100
A_{193}	300 ± 150	225 ± 100	310 ± 60	30 ± 140
$\lambda_{\min} \text{ m}\mu$	$229 \pm 0,5$	228 ± 1	225	227
$[R']_{\min}$	2050 ± 150	2000 ± 100	3100 ± 200	2900 ± 200
$\lambda_{\alpha=0} \text{ m}\mu$	216 ± 2	210 ± 2		204
Proportions en hélice α				
$\frac{b_o - 100}{8}$	23 ± 4	21 ± 4	12,5	20 ± 3
H_{225}	16 ± 5	17 ± 5	$9,5 \pm 3$	17 ± 5
H_{193}	29 ± 4	27 ± 3	12 ± 2	20 ± 4

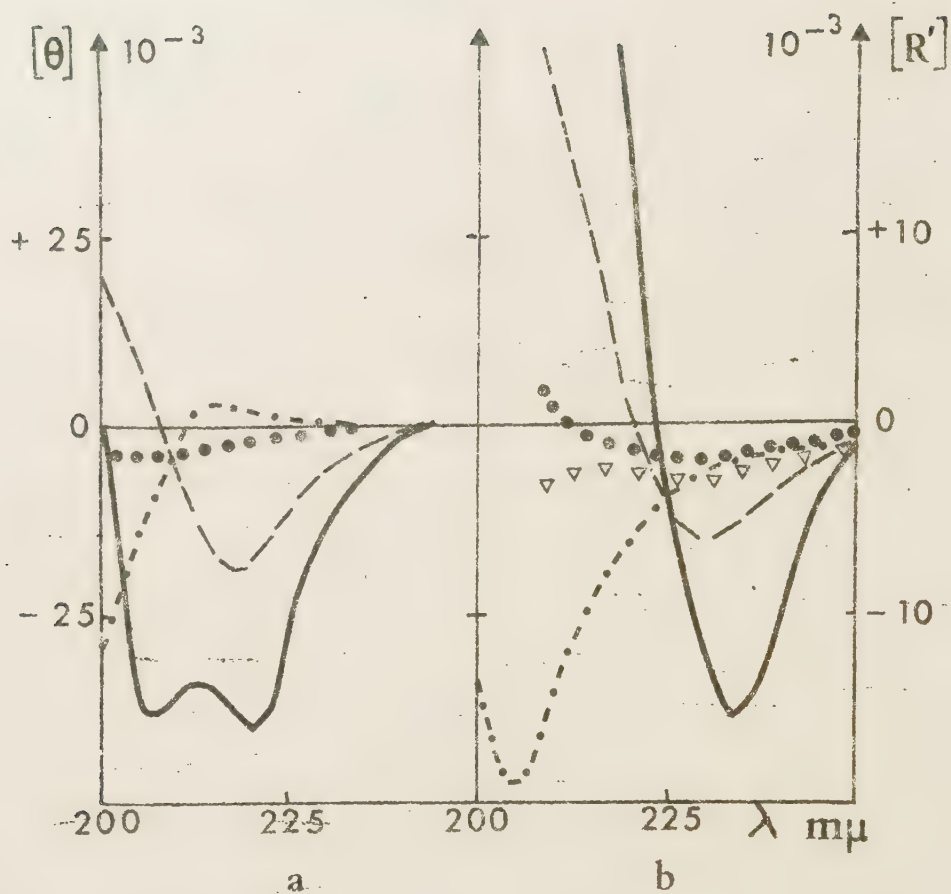


FIGURE 8 : a) Dichroïsme circulaire de la trypsine et de polypeptides synthétiques modèles. L'ellipticité moléculaire $[\theta]$ est exprimée en degrés $\text{cm}^2/\text{décimole}$.

b) D.O.R. de la trypsine et de polypeptides synthétiques modèles. $[R']$ est le PR spécifique par résidu d'acide-aminé rapporté au vide.

Courbe • • • • trypsine pH 2,2 - $\theta = 10^\circ$

$\nabla \nabla \nabla \nabla$ trypsine pH 12,9 - $\theta = 10^\circ$

— trypsine pH 12,9 - $\theta = 10^\circ$ *hélice α*

- • - • - pelote statistique

----- structure β

mélange de ces trois structures. Au contraire, celle de la trypsine dénaturée à pH 13 témoigne de l'existence d'un mélange d'environ 90 % de pelote statistique et de 10 % d'hélice α ou de structure β .

Avant de tirer quelques conclusions de l'étude des dispersions rotatoires de la trypsine en fonction du pH, il paraît utile de faire un certain nombre de remarques.

1) Les relations de Moffitt²⁸ et de Shechter-Blout²⁹ ont été établies pour rendre compte des dispersions rotatoires de polypeptides ou de protéines constitués exclusivement d'hélice α et de pelote statistique. Elles ne peuvent donc en toute rigueur s'appliquer à la détermination du pourcentage en hélice α de protéines contenant des structures autres que l'hélice α et la pelote. Cependant il a été montré, pour la première fois par Imahori⁵³, que la dispersion rotatoire dans le visible de la forme β obéissait à la loi de Moffitt ; il est donc possible de déterminer les proportions en hélice α , structure β et pelote statistique d'une protéine à partir des valeurs conjuguées de a_0 et de b_0 ^{54,51} ; il existe toutefois une certaine imprécision due au fait que la valeur de b_0 pour la forme β n'est pas connue avec certitude⁵⁵.

2) Les effets Cotton de l'hélice α , de la pelote statistique et des différentes structures β des polypeptides synthétiques sont maintenant relativement bien connus et peuvent servir de modèles pour l'identification des structures qui composent une protéine. Cependant, la détermination, par diffraction des rayons X, de la structure spatiale d'un nombre encore restreint de protéines globulaires a mis en évidence que ni l'hélice α , ni surtout la pelote statistique ne constituaient la part essentielle de leur structure. Il apparaît que des protéines comme la chymotrypsine²⁵ ou la ribonucléase⁵⁶ par exemple contiennent de la structure β , mais aussi des portions de chaîne qui, si elles ne présentent aucun enroulement régulier, ne peuvent être assimilées à la pelote statistique. Il doit exister également des hélices différentes de l'hélice α ; c'est ainsi que Schellman et Lowe⁵⁷ ont

récemment suggéré que le minimum d'effet Cotton de la ribonucléase situé à 228 m μ était vraisemblablement dû à l'existence d'hélices courtes ou "tordues".

3) Il apparaît donc relativement difficile d'extrapoler directement les résultats obtenus sur les polypeptides synthétiques au cas des protéines globulaires. De plus, alors que pour les polypeptides de référence, le seul chromophore optiquement actif est la liaison peptidique, il n'en est pas de même pour les protéines. Les acides-aminés aromatiques et les cystines, lorsqu'ils sont dans un environnement asymétrique, présentent des effets Cotton qui ne sont plus négligeables. Leur présence entre 250 et 300 m μ peut perturber l'analyse des dispersions rotatoires par les relations de Moffitt et de Shechter-Blout ; leur présence aux longueurs d'onde inférieures à 250 m μ doit affecter considérablement l'allure des effets Cotton propres à la liaison peptidique. Une étude du dichroïsme circulaire du L-tryptophane effectuée par Myer et Mc Donald⁵⁸ a ainsi mis en évidence l'existence de sept bandes optiquement actives, trois entre 250 et 300 m μ et quatre aux longueurs d'onde inférieures à 250 m μ ; parmi ces dernières, il y a en particulier une bande positive à 224 m μ qui doit nécessairement modifier l'allure des bandes négatives à 218 et 222 m μ de la structure β et de l'hélice α .

Quels sont alors les renseignements qu'apporte l'étude de la dispersion rotatoire de la trypsine sur la structure secondaire de la protéine ? Les restrictions que nous avons énoncées ci-dessus s'appliquent particulièrement à la dispersion rotatoire mesurée entre pH 2 et 11, puisque celle-ci présente des effets Cotton dans la zone d'absorption des acides-aminés aromatiques et des cystines. Nous nous contenterons donc de résultats qualitatifs : la protéine contient vraisemblablement peu d'hélice α (faible valeur de $-b_0$ et allure des effets Cotton vers 230 m μ) mais doit être constituée de forme β et d'une structure apériodique compacte ayant peu d'interactions avec le solvant (faible valeur de $-\alpha$ ou de $-a_0$). Par contre, la dispersion rotatoire de la trypsine dénaturée ne présentant aucune anomalie, on peut en tirer des renseignements

plus précis : environ 90 % de la protéine à pH 13 et 80 % de la protéine thermodénaturée à pH 2 doivent être en pelote statistique.

Il ne faut pas penser cependant que l'étude de la dispersion rotatoire d'une protéine globulaire ne donne des informations que sur la structure secondaire de cette protéine ; dans le cas de la trypsine, en particulier, le bilan en serait plutôt négatif. En réalité, il semble au moins aussi intéressant d'étudier par cette méthode les changements de conformation d'une protéine que d'en déduire la composition en différentes structures.

Les résultats obtenus par dispersion rotatoire confirment l'hypothèse selon laquelle les molécules AHH et C ont des conformations voisines ; en effet, non seulement les valeurs du pouvoir rotatoire sont voisines mais les effets Cotton ont la même allure. On peut déduire de cette dernière observation que les quatre ou cinq tyrosines " normales " de la protéine ^{44,1 et 6} ne sont pas responsables de ces effets Cotton puisque l'ionisation du groupe phénol dans la forme C ne provoque pas de modification de la dispersion rotatoire par rapport à celle de AHH.

Nous montrerons d'autre part dans la deuxième partie de cet exposé que la dispersion rotatoire du complexe formé par la trypsine et un inhibiteur compétitif à pH 10,5 est identique à la dispersion rotatoire de la trypsine à pH 6,9 sous forme BH ; ce résultat constituera un argument majeur pour mettre en évidence que l'inhibiteur se fixe de préférence sur la forme BH plutôt que sur la forme C et provoque ainsi un déplacement de l'équilibre entre BH et C en faveur de BH. Cette étude permettra de montrer que "b" est la conformation optimale de l'enzyme pour la fixation du substrat.

Il a été proposé ci-dessus un schéma (schéma 2 , p.24) rendant compte de la différence de pouvoir rotatoire entre BH et C ou AHH. Le changement de conformation observé doit certainement impliquer le démasquage d'acides-aminés aromatiques, puisque les effets Cotton entre 250 et 300 mμ de la forme BH sont plus importants que ceux de C et de AHH.

Il est cependant clair que le changement de conformation est limité et affecte seulement une portion de la molécule ; en effet, la comparaison des propriétés rotatoires de la protéine dénaturée et des formes AHH et C indique que celles-ci ont encore une structure compacte et organisée.

II. Propriétés spectrales.

L'étude des propriétés rotatoires de la trypsine en fonction du pH a suggéré que la transformation de BH en AHH ou en C conduisait au déploiement d'une portion de la molécule impliquant le démasquage de chromophores aromatiques. Ce phénomène peut être également mis en évidence par comparaison des spectres de solutions de trypsine à différents pH, entre 250 et 320 mμ, tout changement d'environnement au voisinage d'un tryptophane ou d'une tyrosine produisant une modification du spectre d'absorption de l'acide-aminé. Cette étude peut être effectuée jusqu'à pH 8 environ ; au-delà de pH 8, l'ionisation de la fonction phénol des tyrosines entraîne des perturbations spectrales considérables qui permettent le titrage de ces dernières mais qui masquent les autres modifications spectrales envisagées ci-dessus. Nous distinguerons donc et étudierons successivement les propriétés spectrophotométriques de la trypsine aux pH inférieurs à 8 et supérieurs à 8.

1. Modifications spectrales entre pH 1,2 et 8.

Cette étude a été effectuée par spectrophotométrie de différence en utilisant comme référence une solution de trypsine à pH 2. Les mesures étant extrêmement rapides et l'autolyse par conséquent négligeable, on a choisi la température ambiante comme température d'expérience.

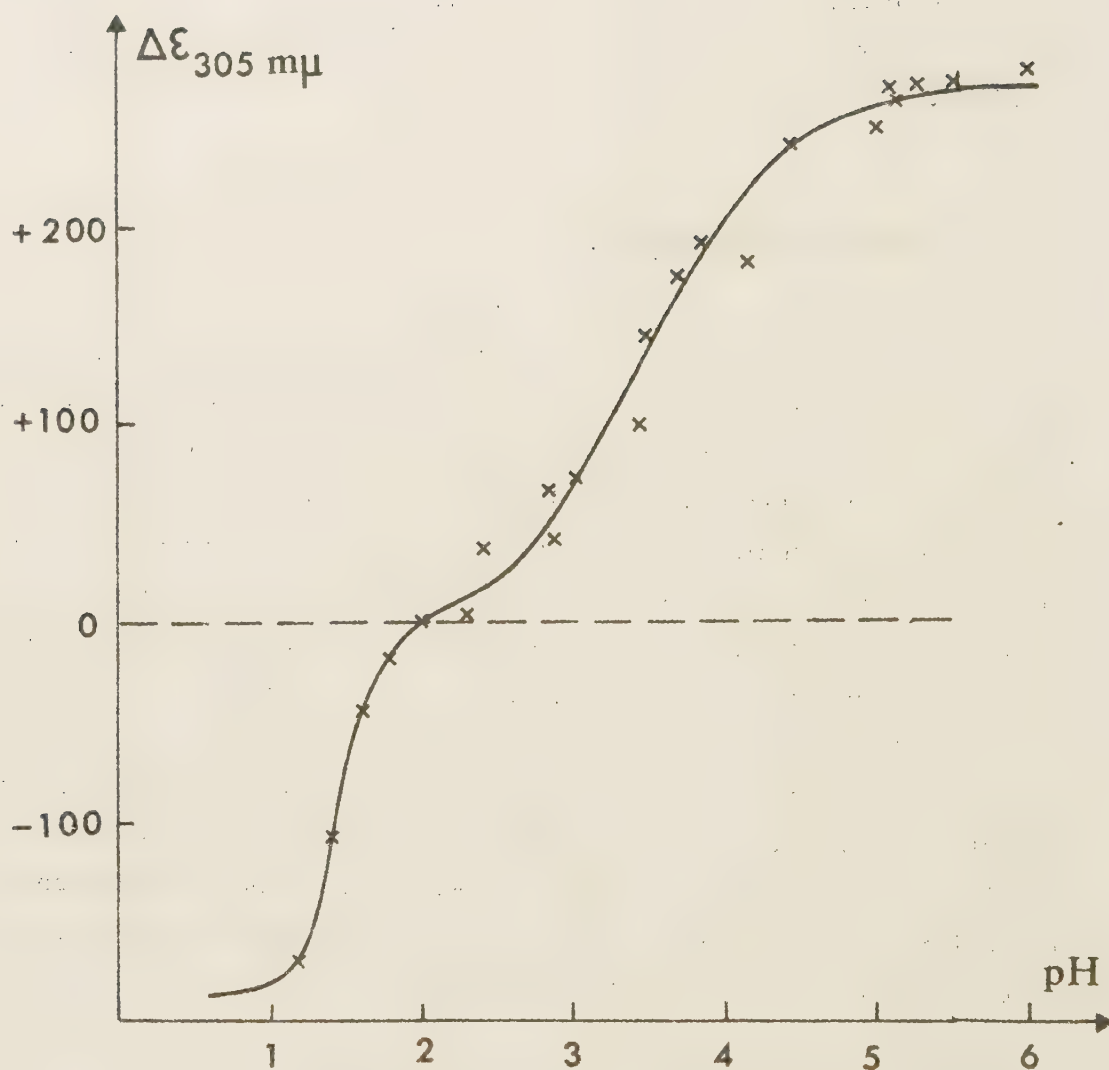


FIGURE 2: Variation de la différence du coefficient d'extinction moléculaire $\Delta\epsilon_{305}$ de la trypsine en fonction du pH.
Cuve de référence : pH 2 - Température d'expérience : $\theta = 20^\circ$.

On constate que les spectres de différence n'ont pas la même allure suivant que le pH de la solution de mesure est supérieur ou inférieur à 2. Nous analyserons successivement les résultats obtenus dans les deux zones de pH correspondantes.

a) Entre pH 2 et 8 .

Les spectres de différence obtenus présentent essentiellement un minimum à 305 m μ et deux maxima à 291 et 284 m μ ^{réf. 59}. Ces deux maxima peuvent être attribués à des transitions $\Pi \rightarrow \Pi^*$ des tyrosines et des tryptophanes ; le minimum situé à 305 m μ est vraisemblablement lié à une transition $n \rightarrow \Pi^*$ des tryptophanes. Weber⁶⁰ a montré en effet que le spectre de polarisation de fluorescence du tryptophane présentait deux pics. On sait d'autre part que selon la transition électronique, la modification de la nature du solvant produit des effets opposés sur les spectres d'absorption : d'une manière générale, une diminution de la polarité du solvant entraîne un effet bathochrome sur les transitions $\Pi \rightarrow \Pi^*$ et un effet hypsochrome sur les transitions $n \rightarrow \Pi^*$. Or, ce phénomène est effectivement observé, lorsqu'on augmente de 2 à 8 le pH d'une solution de trypsine. Il est donc raisonnable de conclure que la transformation de AHH en BH s'accompagne d'un masquage, à l'intérieur du milieu hydrophobe de la protéine, de certains acides-aminés aromatiques de la molécule.

La variation du coefficient d'absorption moléculaire $\Delta\epsilon$ à 305 m μ en fonction du pH entre pH 2 et 8 est représentée sur la figure 9 ; des courbes de même allure sont obtenues aux autres longueurs d'onde. Le pH de demi-variation du phénomène est de 3,5 environ ; cette valeur est en accord satisfaisant avec celle de 3,7 que nous avons obtenue par polarimétrie et avec celle de 3,8 obtenue récemment par East et Trowbridge¹⁴ par spectrophotométrie.

Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus à une température de 30° par Lazdunski et Delaage⁴⁴. Par contre, lorsque leurs expériences ont été effectuées à 10°, ces mêmes auteurs⁶¹ observent que la variation de $\Delta\epsilon$ en fonction du pH présente non plus l'allure d'une sigmoïde unique, mais celle de deux sigmoïdes distinctes dont les points de demi-transition se situent vers pH 3 et 5,2 ; ils attribuent ces variations à deux transitions structurales entre trois formes de la protéine selon le schéma suivant : $\text{III} \rightleftharpoons \text{II} \rightleftharpoons \text{I}$. On est tenté d'assimiler les formes II et III respectivement à celles que nous avons appelé BH et AHH. Le passage de I en II ne s'accompagnant d'aucune modification des propriétés rotatoires de la protéine, il doit s'agir d'un changement de conformation extrêmement limité ; en réalité la simple ionisation d'un groupement de la molécule au voisinage d'un acide-aminé aromatique est suffisante pour perturber le spectre de celui-ci. Des résultats apparemment contradictoires obtenus par polarimétrie et spectrophotométrie de différence peuvent en effet s'expliquer si on admet que contrairement à la variation de pouvoir rotatoire une variation du spectre d'absorption ne correspond pas nécessairement à un changement de structure. De telles observations ont été faites dans le cas d'autres protéines, comme l'ovomucoïde, par exemple⁶².

Les modifications spectrales de la trypsine en fonction du pH doivent être liées d'une part au démasquage de certains acides-aminés aromatiques lors de la transformation de BH en AHH, d'autre part à un changement de l'environnement au voisinage d'acides-aminés aromatiques préalablement exposés au solvant.

b. Entre pH 2 et 1,2.

Les spectres de différence, obtenus en comparant des solutions de trypsine de pH inférieurs à 2 à la solution de référence, présentent un maximum à 305 m μ et deux minima vers 288 et 278 m μ . La variation de $\Delta\epsilon$ à 305 m μ est indiquée sur la figure 9 ; le pH de demi-variation est de 1,5 environ.

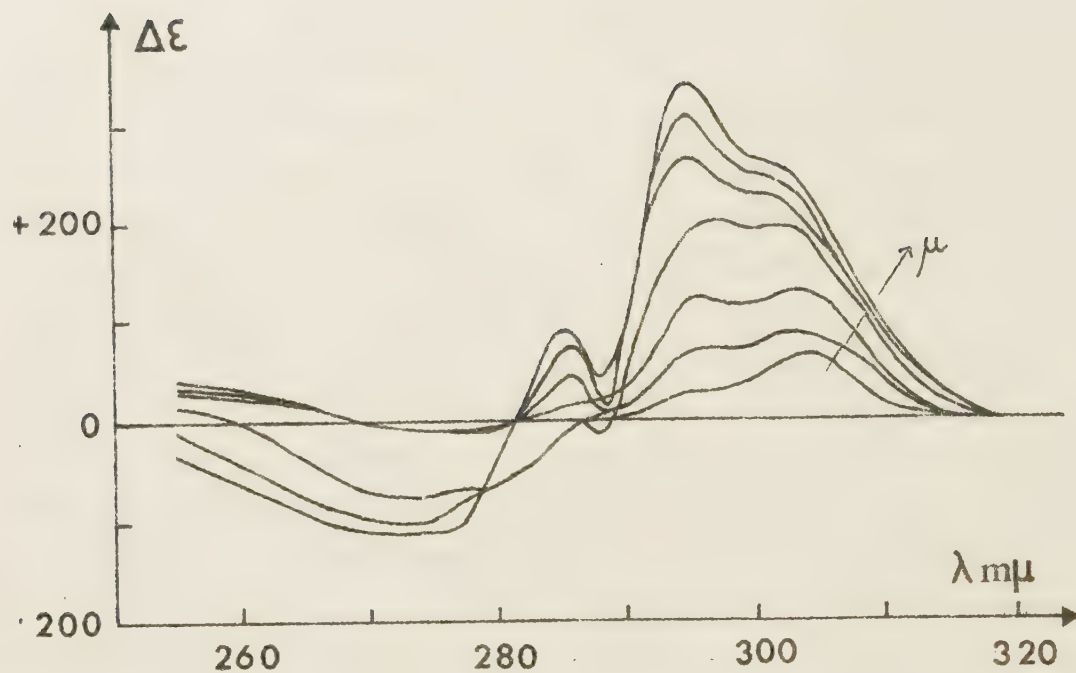


FIGURE 10 : Spectres de différence d'absorption de solutions de trypsine à des forces ioniques croissantes.

Cuve de référence : $\mu = 0,01$.

Cuves de mesure : $\mu = 0,04, 0,07, 0,10, 0,22, 0,30, 0,40$ et $0,60$.

pH d'expérience : pH 2.

Le même résultat a été obtenu par Delaage et Lazdunski⁶¹; les auteurs attribuent cette variation spectrale à une transition structurale entre la forme III et une forme IV. Or, ici encore, la modification du spectre d'absorption de la trypsine lorsqu'on diminue le pH de 2 à 1,2 ne s'accompagne d'aucune variation du pouvoir rotatoire (cf. fig. 1). Le passage de III en IV pourrait être lié soit à un changement limité de la conformation, soit à l'ionisation d'un groupement proche d'un acide-aminé aromatique, soit encore à la protonation du noyau indole des tryptophanes. Bridges et Williams⁶³ ont en effet montré récemment que la protonation du groupe $>NH$ du noyau indole produisait l'extinction de la fluorescence du composé; le pK d'ionisation de ce groupe déterminé par cette méthode est de 1,7, valeur voisine de celle obtenue ci-dessus. Cette modification - quelle que soit sa nature exacte - subie par la trypsine aux pH inférieurs à 2 est à rapprocher du fait que les inhibiteurs compétitifs présentent, comme nous le verrons plus loin, une légère augmentation d'affinité pour l'enzyme dans cette zone de pH¹.

Nous allons montrer par deux autres exemples qu'une variation du spectre d'absorption n'accompagne pas nécessairement une modification des propriétés rotatoires de la trypsine.

c. Effet de la force ionique à pH 2.

Sur la figure 10 sont représentés les spectres de différence obtenus en comparant des solutions de trypsine de forces ioniques croissantes à une solution de référence de μ 0,01. L'augmentation de la force ionique produit un effet bathochrome relativement important; dans les mêmes conditions d'expérience, on ne note par contre aucune variation du pouvoir rotatoire.

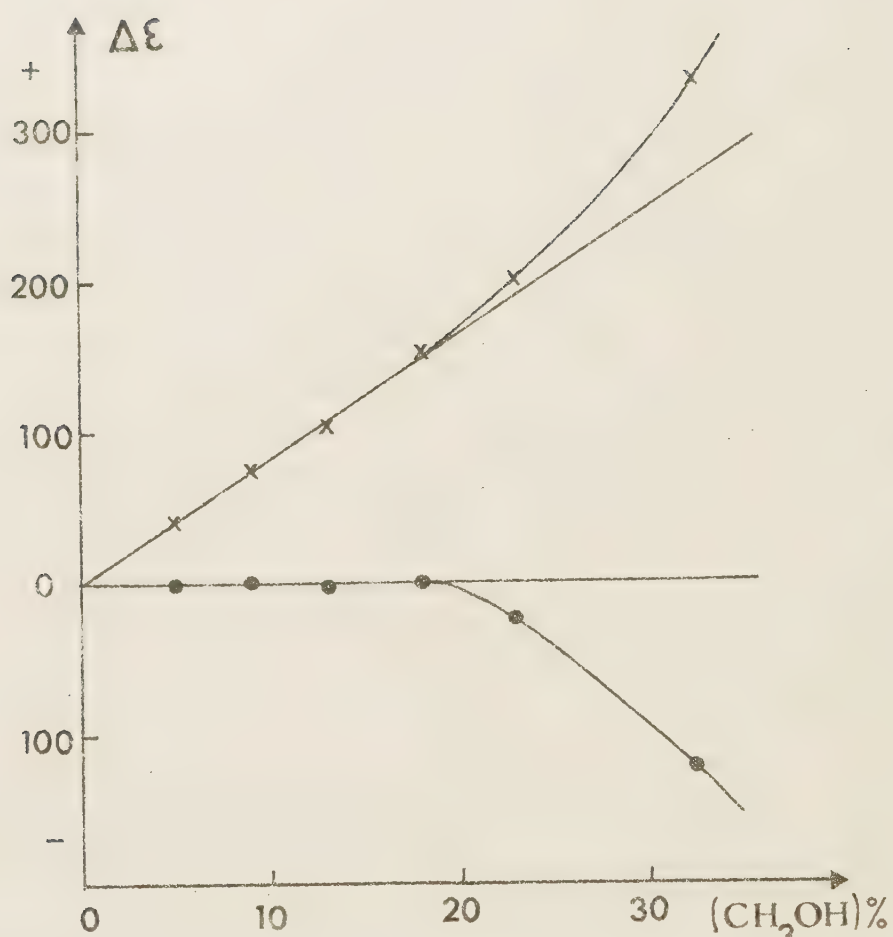


FIGURE 11: Variation de la différence du coefficient d'extinction moléculaire de la trypsine en fonction de la concentration en méthanol.

x : $\Delta\epsilon$ à 227 mμ o : $\Delta\epsilon$ à 298 mμ .

Cuve de référence : (CH₃OH) = 0. pH d'expérience : pH 2.

d. Effet du méthanol à pH 2.

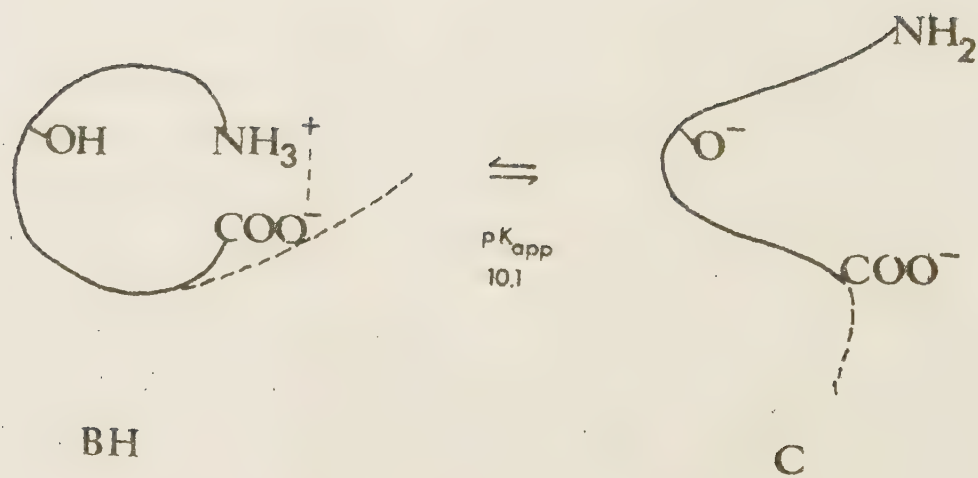
L'addition de méthanol à une solution de trypsine provoque une modification d'absorption que nous avons étudiée par spectrophotométrie de différence. Les variations de $\Delta\epsilon$ à deux longueurs d'onde en fonction de la concentration en méthanol sont représentées sur la figure 11.

Jusqu'à des concentrations en méthanol de près de 20 %, on constate que $\Delta\epsilon_{298}$ reste nul et que $\Delta\epsilon_{277}$ augmente linéairement en fonction de la concentration en alcool : on observe ici un cas typique d'effet de constante diélectrique du solvant sur le spectre d'absorption des chromophores aromatiques exposés à l'extérieur de la protéine. Cette variation spectrale ne s'accompagne pas de modification du pouvoir rotatoire de la trypsine. Au contraire, lorsque la concentration en méthanol dépasse 20 %, on observe qu'une variation non linéaire de $\Delta\epsilon_{298}$ et de $\Delta\epsilon_{277}$ est associée à une augmentation de la lévoration ; la modification spectrale est alors liée non seulement à l'effet de solvant sur les chromophores exposés mais au démasquage des chromophores préalablement situés à l'intérieur de la protéine.

2. Modifications spectrales entre pH 8 et 13 .

Le titrage spectrophotométrique des tyrosines de la trypsine a été effectué par différents auteurs^{64,44} et¹. On distingue deux zones de pH, l'une correspondant au titrage réversible d'environ 5 tyrosines accessibles au solvant, l'autre au titrage plus ou moins réversible selon le pH des 5 autres tyrosines situées à l'intérieur de la protéine (voir la figure 36).

Il ne faudrait pas en conclure cependant que la trypsine " native " c'est-à-dire sous la forme BH, contient 5 tyrosines normales et 5 tyrosines anormales. En effet, la zone d'ionisation des tyrosines normales coïncide avec la zone de transformation de BH en C mise en évidence par polarimétrie. Ce changement de structure est, nous l'avons vu, analogue



SCHEMA 3

à celui qui existe en milieu acide et doit donc s'accompagner de modifications du spectre d'absorption de la trypsine, par suite du démasquage total ou partiel de certains chromophores aromatiques. Si on suppose, par exemple, et seulement pour simplifier le raisonnement, que la transformation de BH en C s'accompagne du démasquage d'une tyrosine, cela signifierait que BH contient en réalité 4 tyrosines normales et non 5. Pour faciliter la compréhension, nous présentons cette hypothèse sous forme de schéma (schéma 3); on a ajouté aux formes BH et C du schéma 2 un groupe tyrosine masqué et protoné dans la forme BH, démasqué et ionisé dans la forme C. La transition de structure entre BH et C, liée à la déprotonation d'un groupement de pK apparent 10,1, l'isoleucine N terminal vraisemblablement, provoque ainsi l'ionisation apparemment normale d'une tyrosine masquée dans la forme BH.

Un argument en faveur de cette hypothèse est donné par les résultats du titrage spectrophotométrique des tyrosines du complexe trypsine-inhibiteur compétitif, dont nous reparlerons dans la deuxième partie de l'exposé: à pH 11, il y a en moyenne une demi tyrosine ionisée de moins dans le complexe que dans l'enzyme libre. La fixation de l'inhibiteur sur la trypsine, maintenant celle-ci sous la forme BH, empêche le démasquage et donc l'ionisation à pH 11 de cette tyrosine exposée au solvant lors de la transformation de BH en C.

Il a été montré d'autre part par Labouesse et Gervais⁶ que, à pH 6,7, environ 4,2 à 4,3 tyrosines de la trypsine pouvaient être acétylées par l'anhydride acétique et devaient donc être exposées au solvant à ce pH.

Nous ne concluerons pas définitivement en disant que la forme BH contient 4 tyrosines exposées et que la forme C en contient 5. On pourrait en effet aussi bien dire que lors de la transformation de BH en C, il y a démasquage partiel de plusieurs tyrosines et non démasquage total d'une seule d'entre elles. Nous attirons simplement l'attention sur le fait que les résultats du titrage spectrophotométrique d'une protéine peuvent être affectés de façon non négligeable par des modifications de structure ayant lieu dans la même zone de pH.

III. Conclusion.

L'étude des propriétés rotatoires de la trypsine bovine a été effectuée entre pH 1,2 et 13, à une température de 10° et une force ionique de 0,4. Dans ces conditions, on constate qu'il existe entre pH 2 et 11 essentiellement trois formes de la protéine en équilibre réversible, AHH, BH et C. La protonation d'un groupement de pK apparent 3,7 ou la déprotonation d'un groupement de pK apparent 10,1 peut rendre compte du passage de la protéine " native " BH aux protéines " transformées " AHH et C. Ces deux dernières formes ayant l'une, une charge électrostatique globale fortement positive ($Z = +20$), et l'autre, une charge nulle ou légèrement négative ($Z \leq 0$), il est bien entendu que la notation AHH ou C ne se réfère qu'à l'état de protonation des deux groupements spécifiques responsables de la transformation ; il en est de même pour BH.

Malgré leur importante différence de charge, AHH et C ont des propriétés rotatoires extrêmement voisines (dispersion rotatoire, effets Cotton...) et donc vraisemblablement des conformations spatiales voisines également. On peut alors supposer que l'obtention de AHH ou de C à partir de BH a lieu par un mécanisme unique ; celui représenté sur le schéma 2, (p.24), suppose que sous l'influence du pH la rupture d'une même liaison entraîne la transformation de BH en AHH ou en C. S'appuyant sur des résultats de cinétique enzymatique, Lazdunski⁶⁵ avait déjà proposé un schéma analogue, dans lequel la structure de la protéine native était maintenue par une liaison entre un carboxyle et une ou deux tyrosines. On pense maintenant qu'il s'agirait plutôt d'une liaison électrostatique à l'intérieur de la protéine entre un carboxyle et l'isoleucine N terminal de la chaîne ; les raisons en sont les suivantes.

L'étude de la structure de la chymotrypsine²⁵ par diffraction de rayons X a mis en évidence que tous les groupes porteurs d'une charge étaient situés à la surface de la protéine, à l'exception de deux d'entre eux, l'isoleucine N terminal et l'acide aspartique 194, voisin immédiat de la sérine " active ". On retrouve dans la trypsine non seulement

le même acide-aminé à l'extrémité N terminal de la chaîne mais surtout un acide aspartique à côté de la sérine " active " 183. La probabilité d'existence d'une liaison électrostatique entre ces deux groupements est extrêmement faible en solution aqueuse ; elle est par contre beaucoup plus élevée dans un milieu peu polaire, comme celui que constitue l'intérieur d'une protéine. Or, Labouesse et Gervais⁶ ont montré que, à pH neutre, l'isoleucine N terminal de la trypsine était inaccessible à l'acétylation. Il est alors vraisemblable que les deux groupements impliqués dans l'interaction ont des pK d'ionisation anormaux dans la forme BH. Nous avons calculé que pour rendre compte des variations du pouvoir rotatoire de la trypsine en fonction du pH, les valeurs des pK étaient environ de 1,7 pour le carboxyle et de 11,8 pour l'acide-aminé N terminal. Dans les formes AHH et C, lorsque les deux groupes n'interagissent plus, ces valeurs redeviennent normales, 5 et 8,3 approximativement .

Nous avons qualifié la forme BH de protéine " native " et les formes AHH et C de protéines " transformées " pour deux raisons : d'une part l'affinité de BH pour les inhibiteurs compétitifs est beaucoup plus grande que celle de AHH ou de C (voir deuxième partie) et d'autre part la conformation de BH doit être plus compacte que celle des deux autres formes puisqu'une portion de la chaîne polypeptidique semble être maintenue par une liaison électrostatique supplémentaire. Il est d'ailleurs vraisemblable que la formation de cette liaison entraîne celle de bien d'autres. La transformation de BH en AHH et en C s'accompagne en effet non seulement d'une augmentation de la lévoration mais aussi du démasquage total ou partiel de un ou plusieurs chromophores aromatiques. Ce démasquage a été mis en évidence à la fois par spectrophotométrie de différence et par dispersion rotatoire dans la zone des effets Cotton des tyrosines et des tryptophanes.

On a remarqué à ce propos que le nombre des tyrosines " normales " d'une protéine, déterminé entre pH 9 et 11 par titrage spectrophotométrique classique, correspondait au nombre des tyrosines " normales "

de la protéine à pH alcalin, mais ne correspondait pas nécessairement au nombre des tyrosines " normales " de la protéine à pH neutre.

Bien que les formes AHH et C aient subi une certaine " dénaturation " par rapport à la forme BH, leur structure est cependant encore extrêmement compacte, si on la compare en particulier à celle de la trypsine irréversiblement dénaturée à pH 13 ou à celle de la protéine réversiblement dénaturée à haute température. Dans ces deux cas, la lévoration de la trypsine a une valeur environ double de celle de AHH ou de C. Du reste, les résultats obtenus par dispersion rotatoire ont montré que la protéine dénaturée à pH 13 ou à haute température était essentiellement en pelote statistique. Au contraire, les courbes de dispersion rotatoire de AHH et de C, aussi bien que celle de BH, sont complexes ; elles témoignent qu'entre pH 2 et 11, la protéine a une structure repliée sur elle-même et peu accessible au solvant.

Si enfin, pour en revenir à l'un des buts de cette étude, on compare l'effet du pH sur la conformation et l'activité enzymatique de la trypsine, on arrive à la constatation suivante : la capacité de fixation du substrat par la trypsine est directement reliée à la conformation de la protéine ; l'activité catalytique en " paraît " indépendante . Dans cette dernière intervient en effet une histidine à l'état non protoné ; or l'ionisation de cet acide-aminé, de $pK \approx 6,5$, ne modifie pas la structure de la protéine. La sérine " active " d'autre part reste protonée entre pH 2 et 11 dans la zone de pH envisagée. Par contre, nous verrons que la fixation du substrat sur l'enzyme est contrôlée par les mêmes groupes de pK apparents 3,7 et 10,1 qui contrôlent la conformation de la protéine. Il faut remarquer que l'ionisation d'un troisième groupe, un carboxyle de $pK 4,5$ qui, lui, assure directement la fixation du substrat par formation d'une liaison électrostatique ^{11-14,1} ne modifie pas la conformation de la protéine.

La forme BH de la trypsine, qui possède la conformation optimale pour la fixation du substrat, pourrait être la forme catalytiquement active: la liaison électrostatique, responsable de la structure particulière de BH, permettrait le rapprochement de l'histidine 46 et de la sérine 182 et donc la formation du centre actif.

B. Effet de la température sur la structure de la trypsine entre pH 1 et 3,7.

Notre but essentiel dans l'étude de l'effet de la température sur les propriétés rotatoires et spectrales de la trypsine a été d'obtenir des renseignements sur les liaisons qui sont rompues au cours de la thermodénaturation et qui sont donc à l'origine du maintien de la conformation de la protéine " native ". Rappelons que nous avons qualifié de " native " la forme BH, prédominante entre pH 5 et 8,5, et de protéines " transformées " réversiblement en milieu acide et alcalin, les formes AHH et C qui ont subi un changement de conformation limité par rapport à BH. Il est malheureusement impossible d'étudier la thermodénaturation de BH par les techniques citées ci-dessus en raison de l'autolyse extrêmement rapide de l'enzyme dès que la température s'élève; nous avons alors étudié la thermodénaturation de AHH à pH 2,1 et également celle du mélange en équilibre de AHH et BH, jusqu'à pH 3,7, pour essayer de déterminer l'influence d'une proportion croissante de forme native.

Les expériences ont été effectuées à une force ionique de μ 0,1 seulement en raison de la précipitation de la protéine dénaturée aux forces ioniques plus élevées.

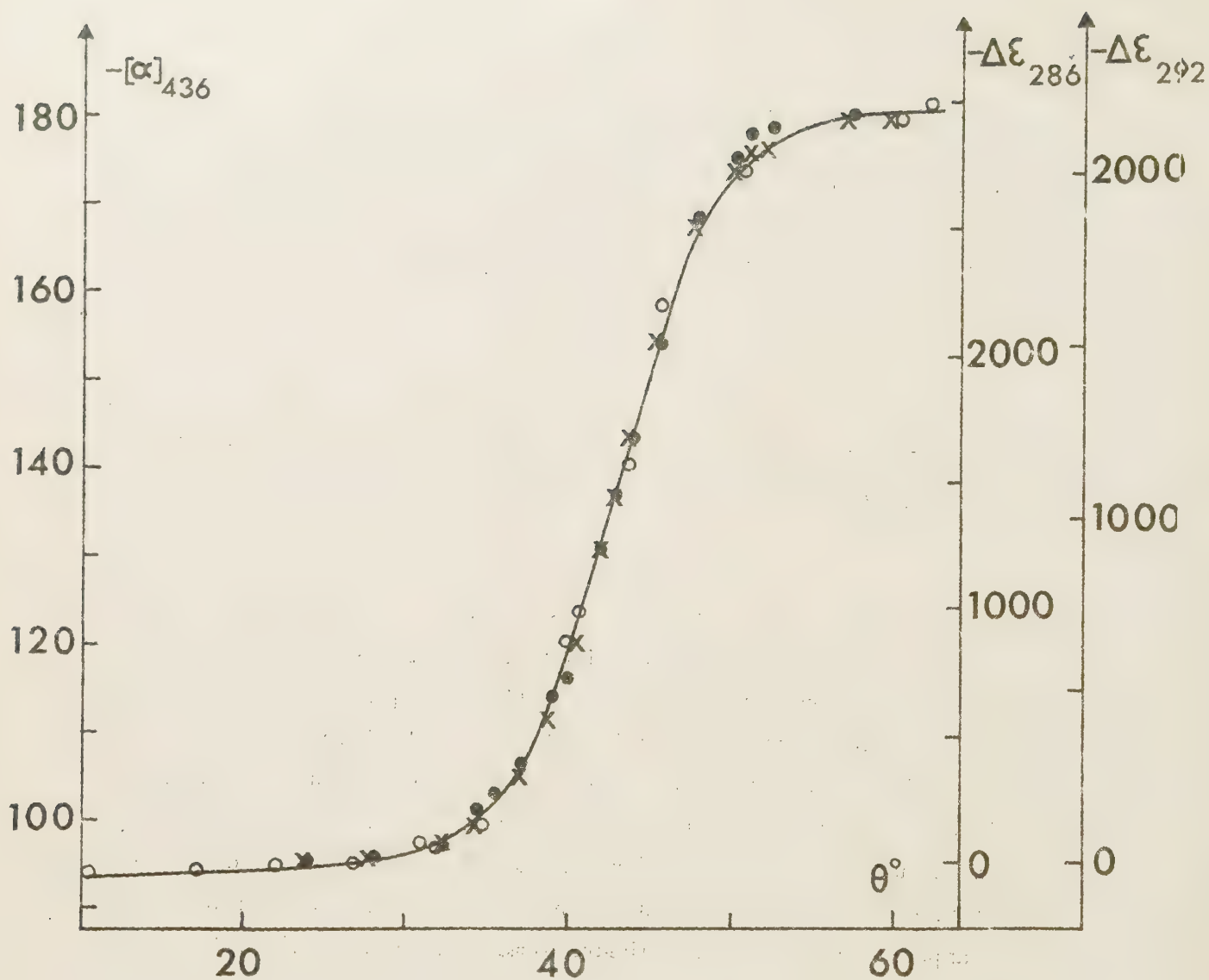


FIGURE 12: Variation du PR spécifique et de la différence des coefficients d'extinction moléculaire de la trypsine en fonction de la température.

○ : $[\alpha]_{436}$ - ● : $\Delta\epsilon_{286}$ - x : $\Delta\epsilon_{292}$

Conditions d'expérience : pH 2,1 - $\mu = 0,1$.

Cuve de référence (pour la spectrophotométrie de différence) : $\theta = 20^\circ$.

1. A pH 2,1 .

Voyons successivement quel est l'effet de l'élévation continue de la température sur les propriétés optiques de la trypsine d'une part et quelles sont les caractéristiques du nouvel état de la protéine obtenu à haute température d'autre part.

a. Variation de la température entre 10 et 60°.

L'élévation de la température d'une solution de trypsine produit une augmentation extrêmement importante de la lévoration de la protéine : la valeur de $[\alpha]_{436}$ passe de -93° à basse température à -180° à haute température (fig. 12). En comparant l'absorbance d'une solution de trypsine dont on augmente progressivement la température à celle d'une solution de référence identique maintenue à 20° , on observe d'autre part l'apparition de spectres de différence qui présentent un point isobestique à 275 m μ . Ces spectres sont caractérisés par deux maxima négatifs à 286 et 292 m μ (fig. 13).

Les valeurs de $[\alpha]$ et de $\Delta\epsilon$ à une température donnée restent constantes en fonction du temps, ce qui indique que le système est en équilibre à toute température (seule une exposition prolongée de la solution aux températures supérieures à 50° provoque une lente modification irréversible des propriétés optiques de la protéine).

La variation en fonction de la température de la différence du coefficient d'extinction de la protéine à 286 et 292 m μ , ainsi que celle de la lévoration à 436 m μ , sont parallèles, comme le montre la représentation de la figure 12. Ces variations sont totalement réversibles et de type coopératif.

La réversibilité du phénomène et le fait que le système soit en équilibre permet d'en calculer les différents paramètres thermodynamiques, à condition d'admettre qu'on est en présence d'une transition entre deux états macroscopiques : $AHH \rightleftharpoons DHH$. La constante d'équilibre

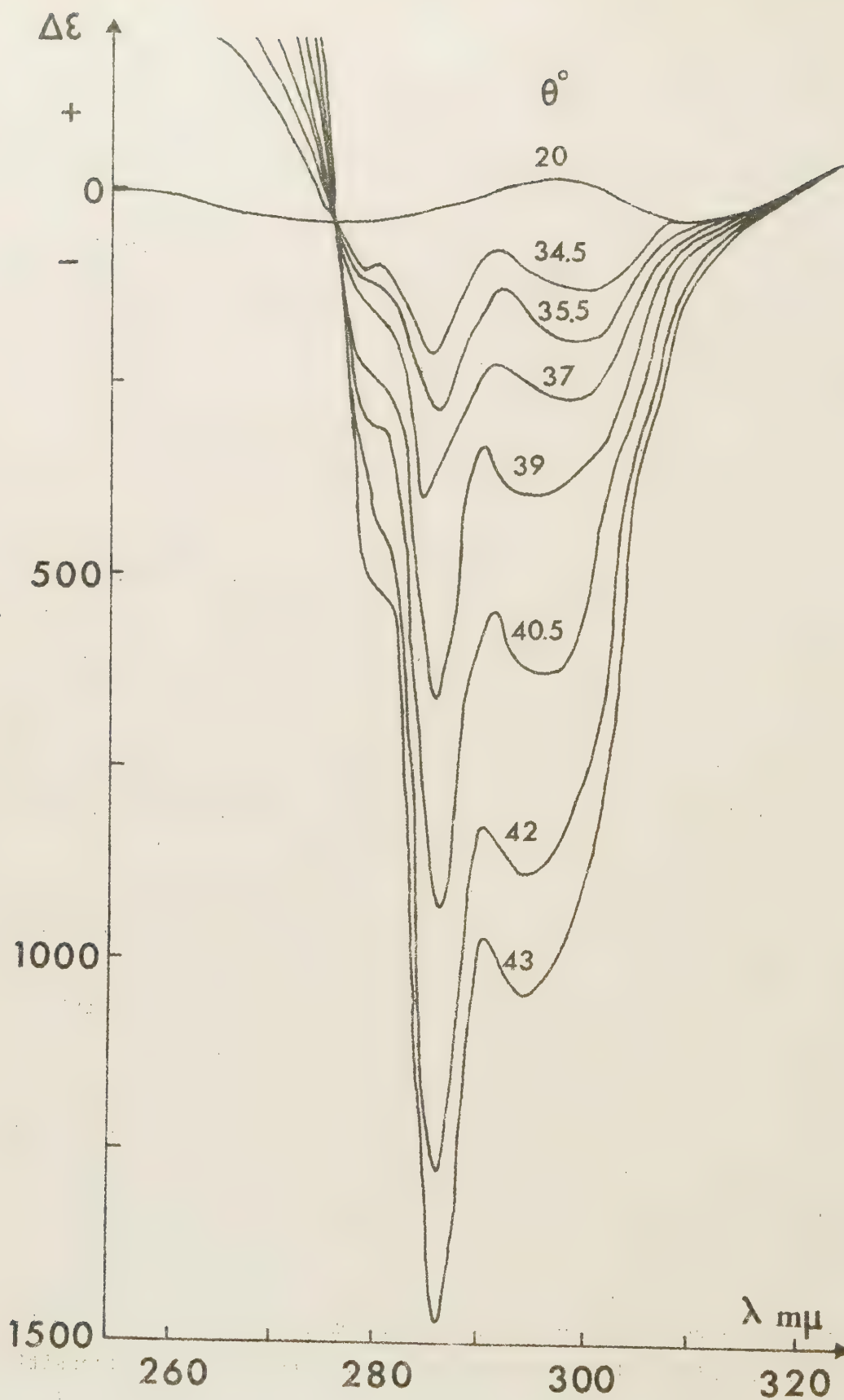


FIGURE 13. Spectres de différence d'absorption de solutions de trypsine à des températures croissantes.
Conditions d'expérience : pH 2,1 - $\mu = 0,1$.
Cuve de référence : $\theta = 20^\circ$.

K est calculée à chaque température à partir des valeurs expérimentales :

$$K_{\theta} = \frac{[\alpha] - [\alpha]_{\text{AHH}}}{[\alpha]_{\text{DHH}} - [\alpha]} = \frac{\Delta\epsilon - \Delta\epsilon_{\text{AHH}}}{\Delta\epsilon_{\text{DHH}} - \Delta\epsilon}$$

$[\alpha]_{\text{AHH}}$ et $\Delta\epsilon_{\text{AHH}}$, $[\alpha]_{\text{DHH}}$ et $\Delta\epsilon_{\text{DHH}}$, caractérisent respectivement les formes AHH et DHH à la température θ et $[\alpha]$ et $\Delta\epsilon$ caractérisent le mélange de ces deux formes à la même température. A partir des valeurs de K, on obtient celles de ΔG , ΔH et ΔS .

Ce procédé de calcul tout à fait classique se heurte cependant d'une manière générale à un certain nombre de difficultés. Les valeurs de $[\alpha]_{\text{AHH}}$, $\Delta\epsilon_{\text{AHH}}$, $[\alpha]_{\text{DHH}}$ et $\Delta\epsilon_{\text{DHH}}$ dans la zone de transition ne sont pas données directement par l'expérience mais sont obtenues par l'extrapolation souvent difficile de leurs valeurs à basse ou haute température. D'autre part, la théorie des deux états qui est à la base de ces calculs a souvent été contestée⁶⁶, dans le cas de la ribonucléase^{67,68} par exemple. Cette théorie a été par contre particulièrement défendue par Lumry, Biltonen et Brandts⁶⁹; ces auteurs et d'autres l'ont appliquée à quelques protéines comme le chymotrypsinogène⁷⁰, la chymotrypsine^{71,72}, la lactoglobuline⁷³, la myoglobine^{74,75} et également la ribonucléase⁷⁶.

Il semble plausible d'appliquer la théorie des deux états à la thermodénaturation à pH 2,1 de la trypsine puisque nous avons vu d'une part que les spectres de différence présentent un point isobestique et d'autre part que les propriétés rotatoires et spectrales de la protéine suivent la même loi de variation en fonction de la température.

A la température de demi-transition, c'est-à-dire à 42,5°, la valeur de ΔH_{app} est de 70 kcal/mole et celle de ΔS_{app} de 220 ue. La précision expérimentale n'est pas suffisante pour qu'on puisse affirmer que la représentation selon Van't Hoff est parfaitement linéaire; d'après Lazdunski et Delaage⁴⁴, celle-ci présenterait une légère courbure qui serait due à une différence de capacité calorifique entre les deux formes en équilibre AHH et DHH.

b. Propriétés de la trypsine à haute température.

A haute température, à partir de 55°, existe essentiellement la forme DHH. L'étude de ses propriétés doit nous apporter des informations sur celles de la forme AHH.

Les principales caractéristiques des propriétés rotatoires de la trypsine réversiblement dénaturée DHH ont été indiquées précédemment. La dispersion rotatoire ne présente plus aucun effet Cotton visible dans la zone d'absorption des acides-aminés aromatiques et soufrés (fig.5, courbe 4) : on observe alors que la loi de Drude est suivie jusqu'à 250 mμ (fig.6, courbe 4) et on peut accorder une plus grande signification aux paramètres de Moffitt et de Shechter-Blout (tableau 3, p.29). Il faut remarquer particulièrement la diminution considérable de a_0 qui passe d'une valeur de -230° pour la trypsine à 10°C à une valeur de -500° pour la trypsine à 55°C ; cette variation qui suit d'ailleurs celle de $[\alpha]$, la valeur de b_0 restant pratiquement constante, indique que la chaîne polypeptidique n'est plus repliée sur elle-même et qu'elle est largement en contact avec le solvant.

Le premier effet Cotton observé présente un minimum négatif à 227 mμ et à cette longueur d'onde le pouvoir rotatoire par résidu d'acide-aminé $[R']$ est égal à $-2\,900 \pm 200^\circ$ (fig. 7, courbe 4).

L'ensemble de ces résultats indique que la forme DHH contient environ 80 % de pelote statistique. Aune et al.⁷⁷ ont mis en évidence dans le cas de trois protéines que celles-ci conservaient un reste de structure organisée lorsqu'on les amenait à pH acide et à haute température ; il est clair qu'il en est de même pour la trypsine réversiblement dénaturée à pH 2,1 et 55°.

Le déploiement de la protéine qui inclue le démasquage des acides-aminés aromatiques - ceux-ci sont répartis tout le long de la chaîne polypeptidique - est également observé spectrophotométriquement. Les bandes d'absorption des tryptophanes et tyrosines sont déplacées vers les courtes longueurs d'onde et diminuent d'intensité. Ce phénomène est tout à fait analogue à celui que l'on observe lors de l'autolyse

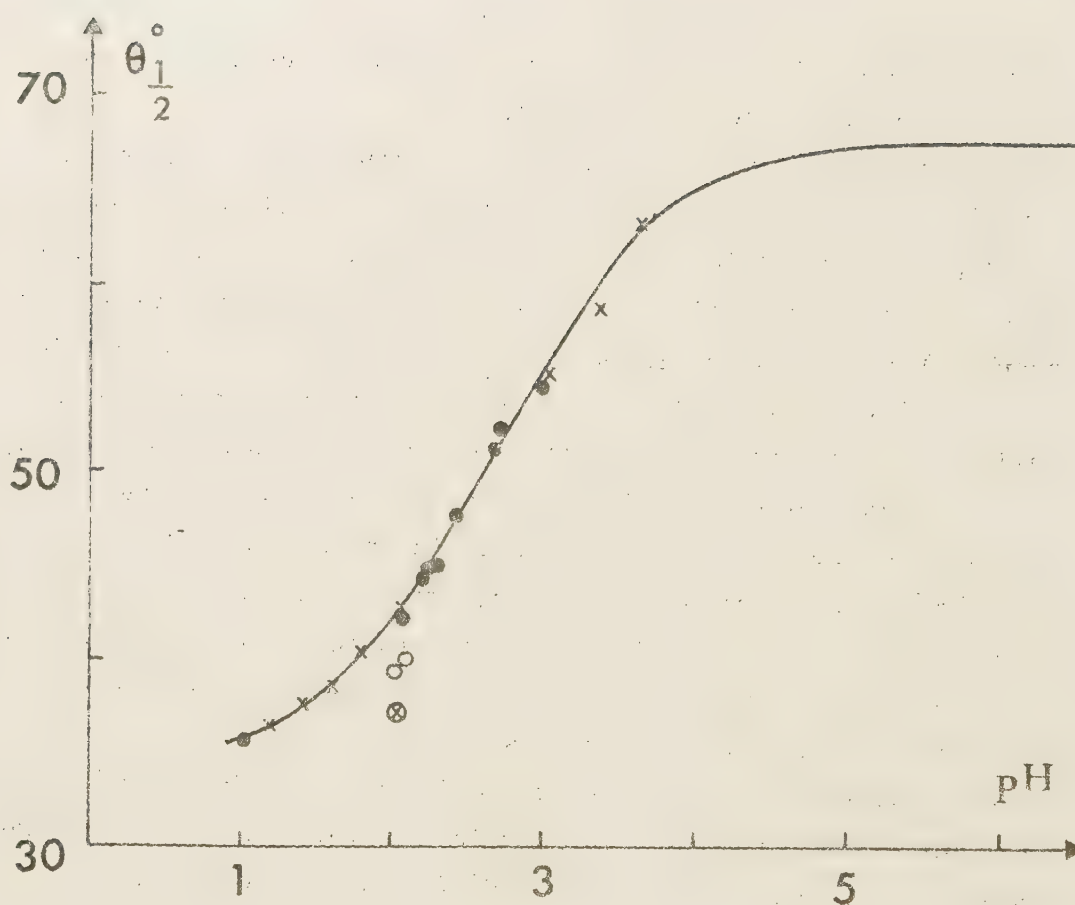


FIGURE 14 : Variation de la température de demi-transition thermique en fonction du pH. Les croix (x) représentent des valeurs de $\theta_{1/2}$ déterminées par spectrophotométrie de différence. Les ronds (•) représentent des valeurs de $\theta_{1/2}$ déterminées par polarimétrie ; les symboles (o) et (⊗) désignent que les mesures ont été effectuées en présence d'un inhibiteur compétitif, la benzylamine, à des concentrations respectives de 0,1 et 0,3 M. Le palier représenté entre pH 5 et 6 est tiré du travail de Lazdunski et Delaage.⁽⁴⁹⁾

de la trypsine et met en évidence que les chromophores aromatiques sont passés d'un milieu peu polaire à l'intérieur de la protéine au contact du solvant aqueux.

La différence considérable qui existe entre les propriétés rotatoires et spectrales de DHH et de AHH - et a fortiori de DHH et de BH - d'une part, l'analogie de la transition AHH-DHH avec la transition hélice α -pelote statistique d'autre part, mettent en évidence que la conformation essentielle de la trypsine à basse température, puisqu'elle n'est pas l'hélice α , doit être une structure dont les différents éléments sont maintenus entre eux de façon coopérative par un grand nombre de liaisons non covalentes.

2. Entre pH 1,0 et 3,7.

La variation en fonction de la température du pouvoir rotatoire ou de l'absorbance d'une solution de trypsine à des pH compris entre 1 et 3,7 a la même allure que celle représentée sur la figure 12; on remarque cependant que la température de demi-transition $\Theta_{1/2}$ est d'autant plus faible que le pH est plus bas, comme si la trypsine se thermodénaturait plus facilement à pH acide. Les valeurs de $\Theta_{1/2}$ déterminées à différents pH sont indiquées sur la figure 14. Ces valeurs sont en bon accord avec celles obtenues spectrophotométriquement par Lazdunski et Delaage⁴⁹; en suivant la perte d'activité de l'enzyme en fonction de la température, ces auteurs ont en outre déterminé la valeur de $\Theta_{1/2}$ à pH 7 et 8.

A côté de cet effet très important du pH sur la valeur de $\Theta_{1/2}$, on constate qu'aux pH supérieurs à 2,5, les spectres de différence d'absorption de solutions de trypsine à des températures croissantes ne présentent plus de point isobestique (fig.15). Ce phénomène indique qu'on est en présence de plus de deux formes en solution.

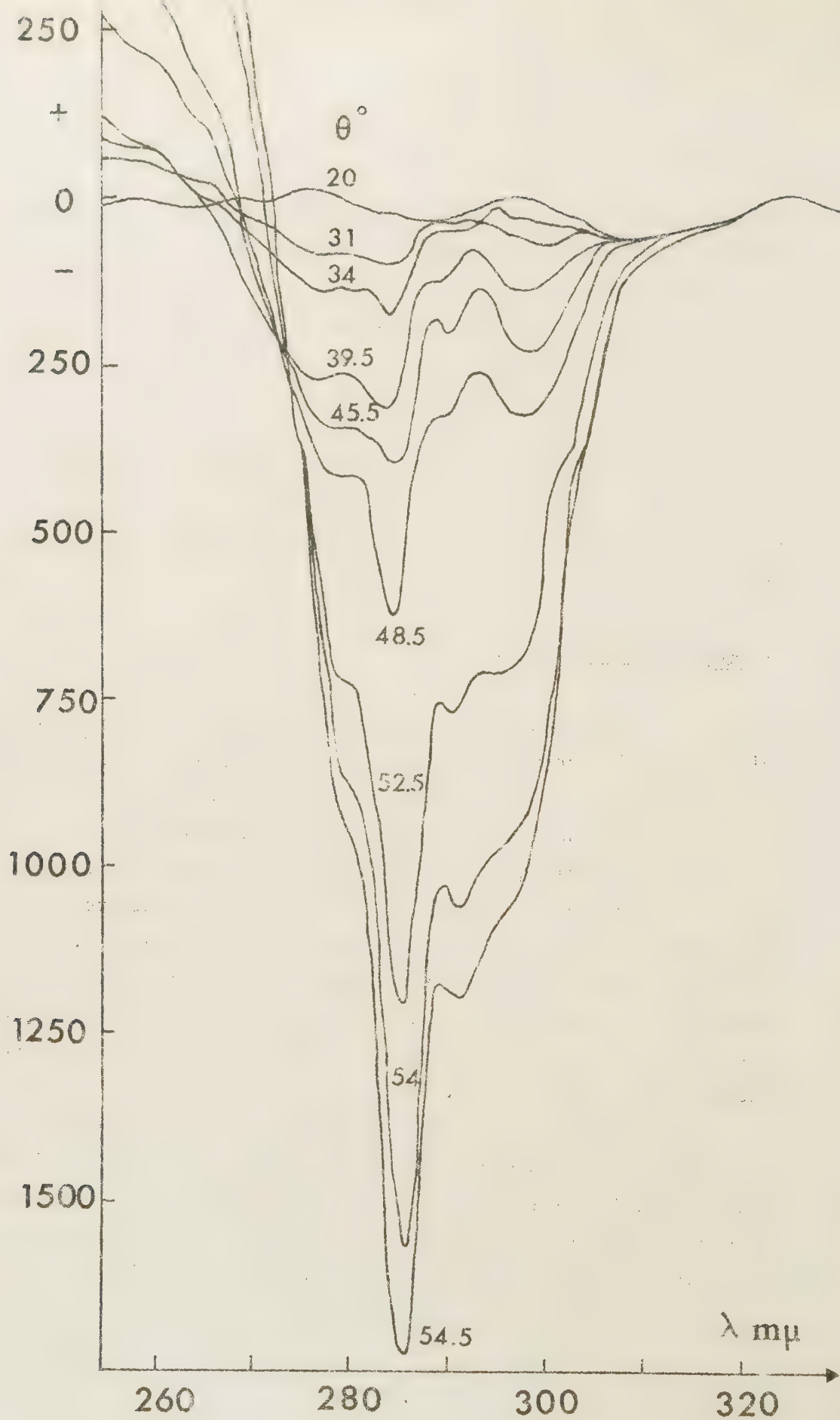
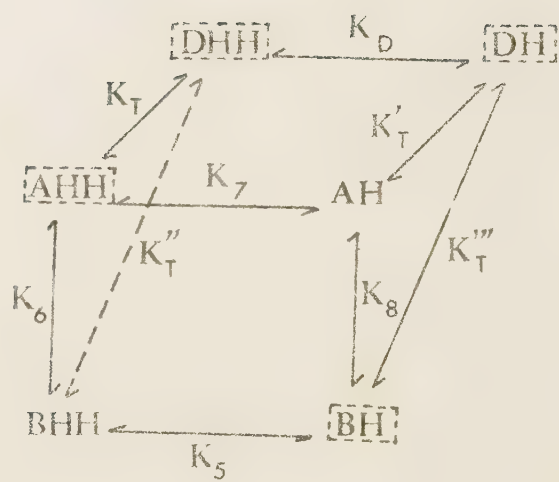


FIGURE 15 : Spectres de différence d'absorption de
solutions de trypsine à des températures
croissantes.
Conditions d'expérience : pH 3,0 - μ = 0,1.
Cuve de référence : Θ = 20°.



SCHEMA 4

La dépendance vis-à-vis du pH de la transition thermique d'une protéine est due au fait que, en fonction du pH, la protéine subit une modification de sa charge électrostatique et présente éventuellement le démasquage de certains groupes ionisables⁷⁰. Cette deuxième raison doit jouer en particulier dans le cas de la trypsine qui sous la forme BH possède au moins un carboxyle masqué de plus que la forme AHH.

On peut proposer un schéma identique au schéma 1 (p.20) en y ajoutant les formes DHH et DH thermodénaturées (Schéma 4). On suppose qu'à haute température les formes DHH et DH⁴⁴ sont identiques (conformation "d") et que $K_D = K_7$. En utilisant les valeurs précédemment attribuées aux constantes K_5, K_6, K_7 et K_8 , on obtient les égalités suivantes :

$$K_T = K'_T \quad ; \quad K''_T = 10^2 K_T \quad ; \quad K_T = 2.10^1 K'''_T.$$

Les deux formes principales à basse température étant AHH et BH et étant donnée la dernière relation ci-dessus qui peut encore s'écrire $\frac{(DHH)}{(AHH)} = 20 \frac{(DH)}{(BH)}$, il est clair que BH est beaucoup plus stable vis-à-vis de la thermodénaturation que AHH et que par conséquent la température de demi-transition sera d'autant plus élevée que la proportion en forme BH sera plus grande.

Ce phénomène ne peut cependant à lui seul expliquer la forte dépendance de $\Theta_{1/2}$ en fonction du pH, en particulier aux pH inférieurs à 2 ; un facteur électrostatique doit également y apporter sa contribution. Il a été montré en effet qu'aux pH inférieurs à 2, la température de demi-transition dépendait de la force ionique du milieu⁴⁴.

L'étude des transitions thermiques de la trypsine à pH 2,1 en présence d'un inhibiteur compétitif de l'enzyme, la benzylamine, a donné des résultats au premier abord surprenants. On constate en effet que la température de demi-transition est d'autant plus faible que la concentration en benzylamine, c'est-à-dire celle en complexe inhibiteur-enzyme, est plus élevée (fig. 14). (A pH 2,1, la constante apparente d'inhibition de la benzylamine étant égale à 6.10^{-2} M, la proportion

d'enzyme sous forme de complexe est de 60 % et 80 % environ pour des concentrations en inhibiteur de 0,1 et 0,3 M). Nous verrons dans la deuxième partie de l'exposé que les inhibiteurs compétitifs de la trypsine se fixent sur BH et non sur AHH et déplacent ainsi l'équilibre entre les deux formes en faveur de BH. On s'attendrait donc à ce qu'à pH 2,1 la température de demi-transition de la trypsine en présence de benzylamine soit plus élevée que celle de la trypsine en absence de benzylamine. Le résultat contradictoire obtenu peut s'expliquer si on suppose que la forme BHH fixe également l'inhibiteur, avec une affinité inférieure à celle de BH, mais supérieure à celle de AHH ; en présence d'inhibiteur, la forme BHH n'est alors plus en quantité négligeable. Comme nous avons ci-dessus la relation $K_T'' = 10^2 K_T$, ce qui indique que BHH est beaucoup moins stable vis-à-vis de la thermodénaturation que AHH, l'augmentation de la concentration de BHH en présence d'inhibiteur s'accompagnera d'une diminution de la température de demi-transition thermique.

C. Effet de la concentration en protéine sur la structure tertiaire et quaternaire de la trypsine à pH 2,1 et à pH 4,8.

1. A pH 2,1.

Il est bien connu que, à pH 2,1, la trypsine reste sous forme monomère quelle que soit la concentration en protéine^{78,79}. Nous avons d'ailleurs constaté que, à ce pH, la dispersion rotatoire de la trypsine, de même que sa thermodénaturation étudiée soit par polarimétrie, soit par spectrophotométrie de différence, étaient indépendantes de la concentration, entre 1 et 10 mg/ml de protéine.

Cependant, Arrio⁸⁰, étudiant cette même thermodénaturation en suivant la variation de la fluorescence des tryptophanes de la trypsine, a observé que la température de demi-transition $\Theta_{1/2}$ était d'autant plus basse que la concentration en protéine était plus faible, entre 1 mg/ml et 1 μ g/ml.

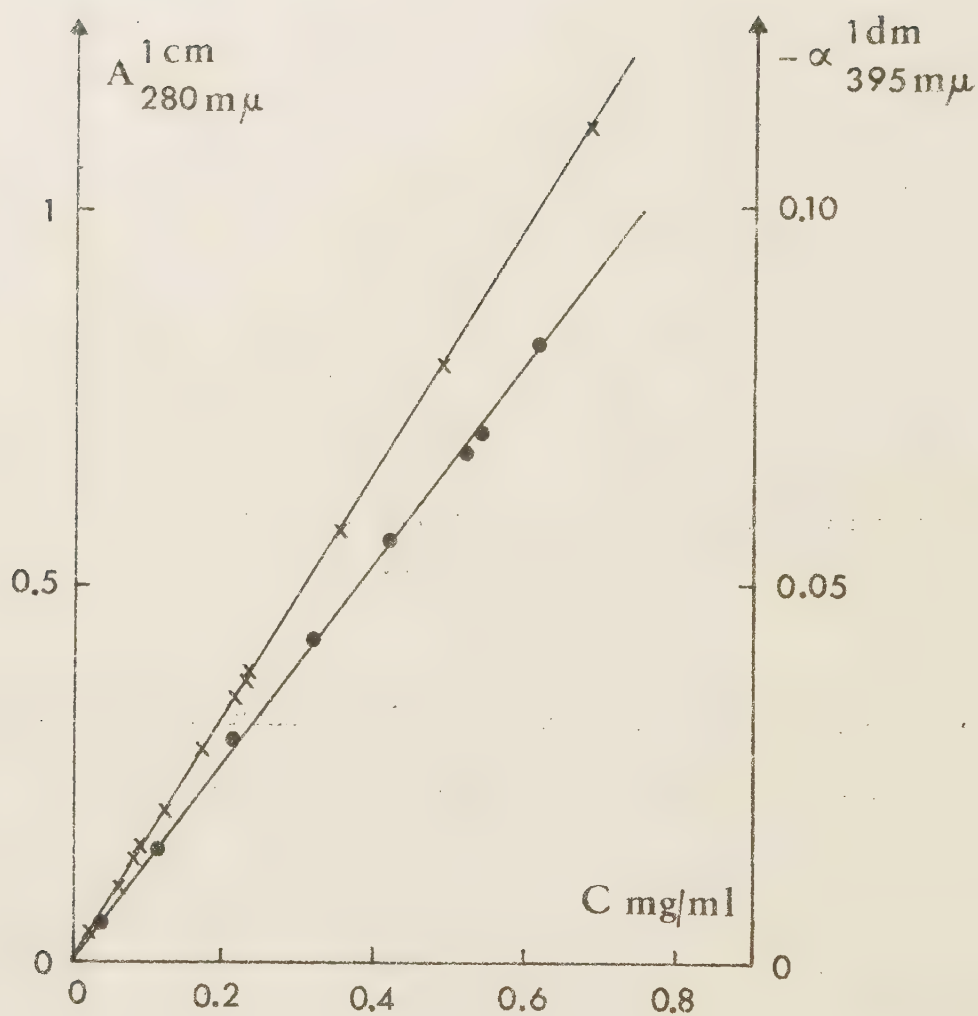


FIGURE 16: Variation de l'absorbance à 280 mμ (x) et de la rotation optique à 395 mμ (•) en fonction de la concentration en protéine. (Les valeurs de A aux faibles concentrations de trypsine ont été mesurées à l'aide d'une cuve de 10 cm et ramenées ensuite à un trajet optique de 1 cm).

Conditions d'expérience : pH 2,1 - $\mu = 0,01$ - $\theta = 10$ et 20° .

Afin de savoir si ce phénomène était lié à une fragilisation par dilution de la trypsine, nous avons étudié avec Arrio l'effet de la concentration en protéine sur le pouvoir rotatoire et l'absorbance de l'enzyme. Les mesures ont été effectuées à μ 0,01, force ionique qui avait été choisie pour les expériences fluorimétriques.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 16 : la rotation optique à 395 m μ et l'absorbance à 280 m μ sont strictement proportionnelles à la concentration de trypsine jusqu'à 0,02 mg/ml. Les valeurs sont les mêmes à 10 et 20°. D'autre part, la température de demi-transition thermique d'une solution de trypsine de concentration 0,1 mg/ml déterminée par polarimétrie à 240 m μ est de 42° ; cette valeur est identique à celle obtenue pour des solutions de trypsine de concentration variant entre 1 et 10 mg/ml, mais très différente de celle déterminée par fluorimétrie pour une même concentration en protéine ($\theta_{1/2} = 37^\circ$)^{réf. 81}.

Il semble donc d'après les critères ci-dessus que la trypsine à pH 2,1 conserve la même forme AHH quelle que soit sa concentration. Les résultats contradictoires obtenus par fluorimétrie restent à expliquer.

2. A pH 4,8.

La polymérisation de la trypsine, étudiée par différents auteurs^{78,79}, est maximale vers pH 5,5 ; elle décroît de part et d'autre de ce pH pour s'annuler vers pH 3 et 8. Ce phénomène ne suit donc pas la même variation en fonction du pH que l'activité enzymatique ou que les propriétés rotatoires.

A pH 4,8, on est en présence essentiellement de la forme BH et, pour cette raison, nous avons étudié l'effet de la concentration en protéine sur différentes propriétés physicochimiques de l'enzyme à cette valeur de pH afin d'essayer de relier entre elles polymérisation, activité et conformation de la trypsine.

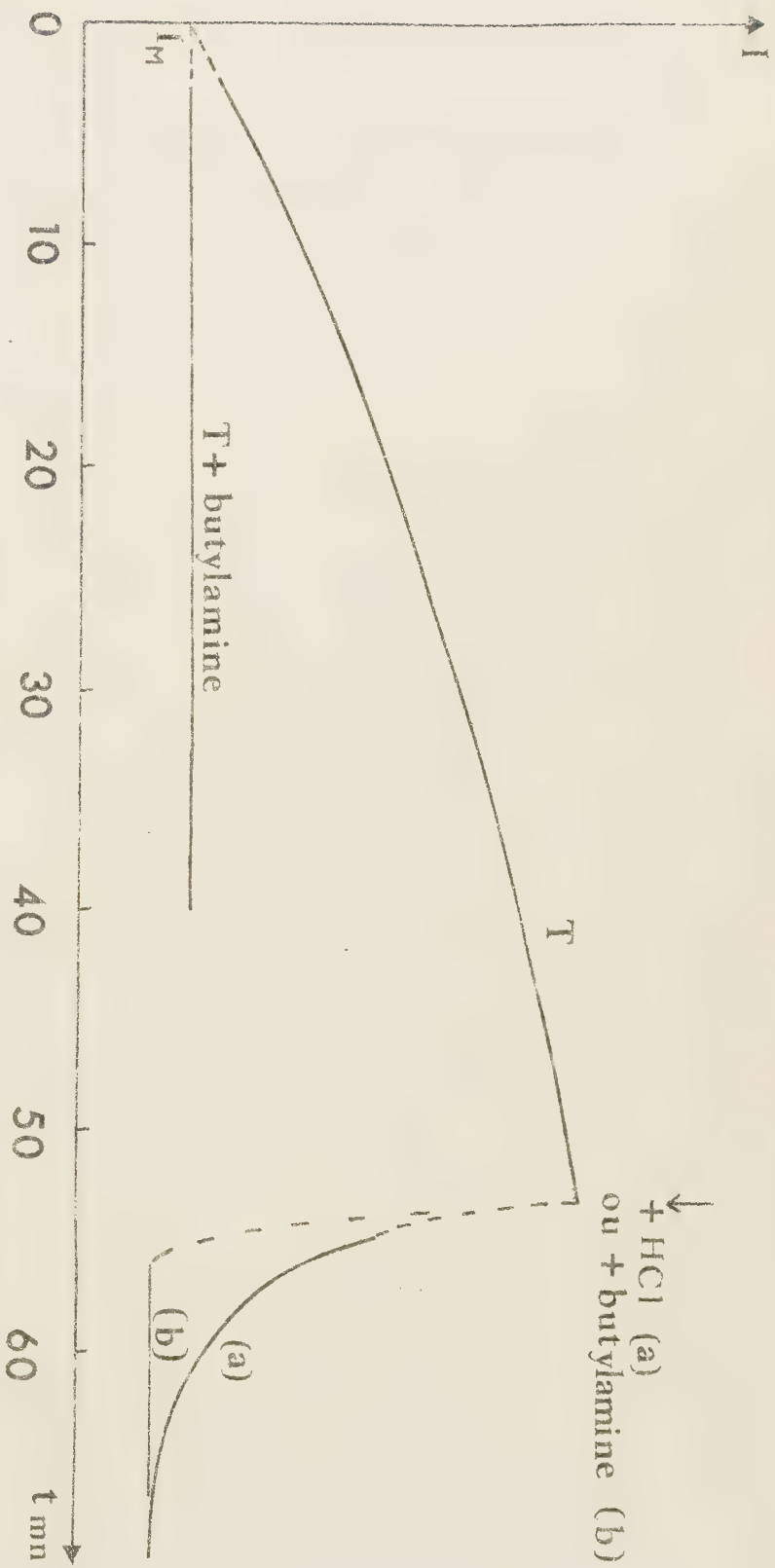


FIGURE 17 : Cinétiques de variation de l'intensité de la lumière diffusée I par la trypsine dans différentes conditions. I est en unités arbitraires ; I_M représente l'intensité diffusée par la trypsine sous forme monomère ($M = 23\ 500$).

Conditions d'expérience : Courbe T : trypsine 11bce ; pH 4,8 - $\mu = 0,3$ - $\Theta = 10^\circ$ - (trypsine) = 4,5 mg/ml
 Au temps t indiqué par la flèche, addition : a) d'HCl N : pH 2,1 - $\mu = 0,3$ - $\Theta = 10^\circ$ - (trypsine) = 4,3 mg/ml

b) de butylamine 5 M, inhibiteur compétitif de la trypsine :
 pH 4,8 - $\mu = 0,4$ - $\Theta = 10^\circ$ - (trypsine) = 4,3 mg/ml -
 (butylamine) = 0,1 M.

Courbe T + butylamine : trypsine en présence d'inhibiteur : pH 4,8 - $\mu = 0,3$ -
 (trypsine) = 4,5 mg/ml - (butylamine) = 0,1 M.



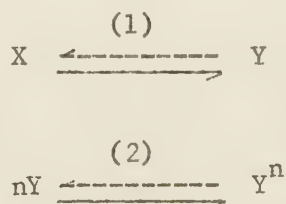
FIGURE 18: Variation de la masse moléculaire moyenne en poids de la trypsine en fonction du temps.
 Concentrations de trypsine en mg/ml :
 ● : 2,1, x : 3,7 , Δ : 4,5, ○ : 7,5 et 10,2.
 Conditions d'expérience : pH 4,8 - $\mu = 0,3$ - $\theta = 10^\circ$.

Les expériences ont été effectuées à 10° et μ 0,3-0,4, comme pour l'étude des propriétés rotatoires de la trypsine ; ces conditions de température et de force ionique sont différentes de celles qui avaient été utilisées dans les études antérieures ^{78,79}.

a. Diffusion de la lumière.

A pH 4,8 , 10° et μ 0,3, la polymérisation de la trypsine n'est pas instantanée. Nous avons en effet observé que l'intensité I de la lumière diffusée par une solution de trypsine augmente en fonction du temps (fig. 17, courbe T). L'intensité diffusée au temps zéro correspond à celle du monomère de poids moléculaire 23 500 ; l'intensité diffusée au bout de quelques heures correspond à un polymère de poids moléculaire supérieur à celui du dimère.

Les mesures ont été effectuées pour des concentrations variant entre 2 et 10 mg/ml. On remarque que, aux concentrations les plus faibles, la cinétique de variation de I n'a pas exactement l'allure de celle représentée sur la figure 17 ; l'augmentation de I est précédée par un temps de latence, d'autant plus long que la concentration est faible, pendant lequel on n'observe aucune variation de I . Ces résultats semblent signifier que l'étape de polymérisation succède à une étape préliminaire d'isomérisation, selon le schéma suivant :



La variation en fonction du temps de la masse moléculaire moyenne en poids $\bar{M}_w$ de la trypsine, représentée sur la figure 18 pour quelques concentrations, est en faveur de cette interprétation. On constate en effet que la vitesse de variation de $\bar{M}_w$, c'est-à-dire la vitesse

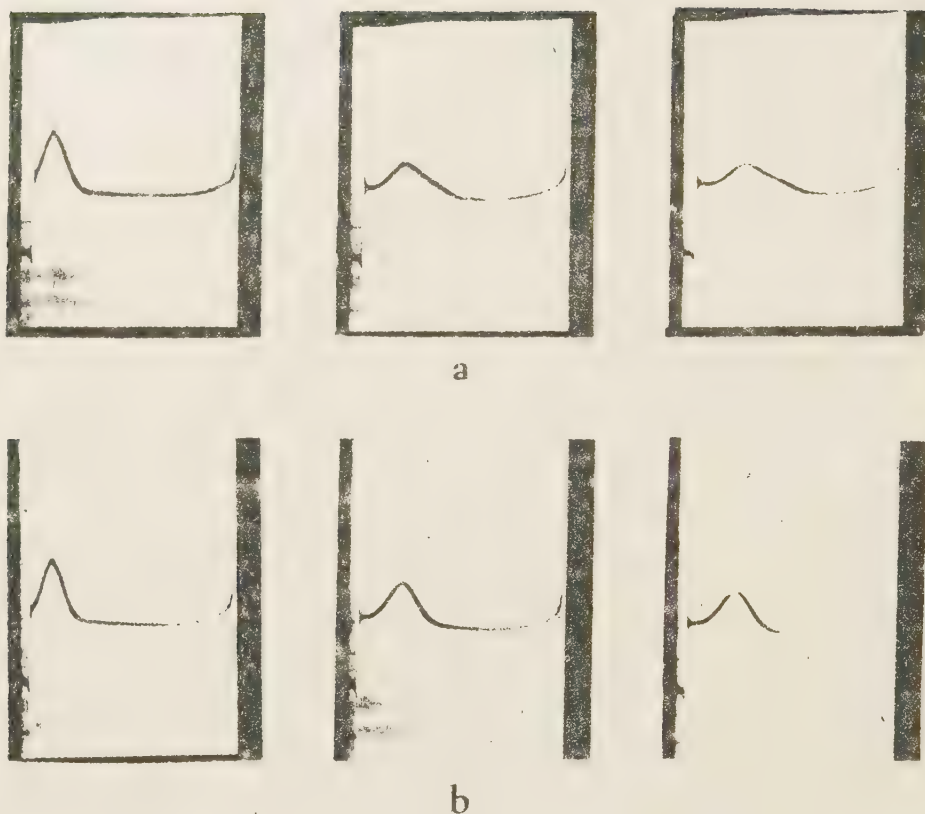


FIGURE 19: Clichés d'ultracentrifugation de solutions de trypsine, en absence (a) et en présence de butylamine (b).

Conditions d'expérience : pH 4,8 - $\mu = 0,3$ - $\theta = 10^\circ$ -

(trypsine) = 4,9 mg/ml.

Les photographies (de gauche à droite) ont été effectuées au bout de : (a) : 40, 88 et 104 mn, (b) : 46,86 et 94 mn.

de variation de l'intensité spécifique diffusée par la solution ($\bar{M}_w = \kappa \frac{I}{c}$), augmente en fonction du temps pour les faibles concentrations en protéine et devient indépendante de c aux fortes concentrations. L'étape limitante de la réaction globale est la polymérisation (2) aux faibles concentrations, puis devient l'isomérisation (1) aux fortes concentrations.

La polymérisation, sinon l'isomérisation que l'on ne peut déceler qu'indirectement par cette technique, est totalement réversible. L'abaissement du pH jusqu'à pH 2,1 par addition d'HCl N à une solution de trypsine en cours de polymérisation provoque une diminution de l'intensité diffusée jusqu'à une valeur de I correspondant à celle du monomère (fig.17, courbe T a).

Un autre moyen de réverser la polymérisation, mais en restant à pH 4,8, est d'ajouter à la solution de trypsine une quantité saturante d'un inhibiteur compétitif de l'enzyme, comme la butylamine (fig.17, courbe T b).

Si l'addition de cet inhibiteur précède le moment où la solution de trypsine est amenée à pH 4,8, on n'observe aucune polymérisation de l'enzyme en fonction du temps (fig. 17, courbe T + butylamine). Tout se passe comme si la formation du complexe enzyme-inhibiteur compétitif empêchait la polymérisation de la protéine.

b. Ultracentrifugation analytique.

Ces résultats ont été confirmés par ultracentrifugation analytique. Sur la figure 19 a sont représentés des clichés d'ultracentrifugation d'une solution de trypsine libre. On constate l'existence de deux pics de sédimentation. Le premier correspond à la protéine monomère, le second à un polymère.

Les clichés de la figure 19 b correspondent au complexe enzyme - butylamine. On observe un seul pic symétrique dont le coefficient de sédimentation est celui du monomère de la trypsine. Un diagramme iden-

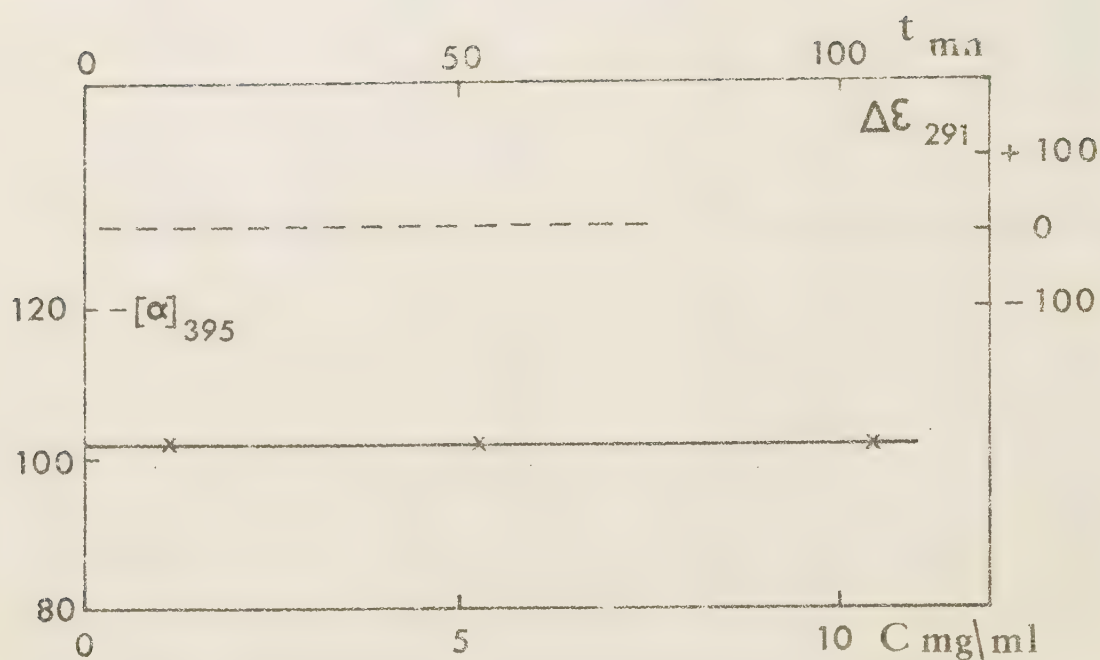


FIGURE 20: Effet de la polymérisation sur les propriétés de la trypsine.

Conditions générales d'expérience : pH 4,8 - $\mu = 0,3$ - $\theta = 10^\circ$.

— : variation de $[\alpha]_{395}$ en fonction du temps. (trypsine) = 6,5 mg/ml.

X : variation de $[\alpha]_{395}$ en fonction de la concentration en protéine.

- - - : variation de $\Delta\epsilon_{291}$ en fonction du temps. (trypsine) = 5,8 mg/ml.

La cuve de référence est à pH 2,1 et sert seulement de cale optique ; la variation en fonction du temps de $\Delta\epsilon$ indiquée sur la figure se rapporte au changement d'absorbance de la solution de mesure par rapport au temps zéro.

tique est obtenu avec une solution de trypsine incubée pendant une heure à pH 4,8 et à laquelle on a ajouté avant d'effectuer l'ultracentrifugation une quantité saturante d'inhibiteur.

c. Propriétés rotatoires et spectrales.

Les résultats des expériences effectuées par diffusion de la lumière impliquaient qu'une phase d'isomérisation précédait celle de polymérisation. Nous avons essayé de la mettre en évidence en étudiant l'effet du temps et de la concentration sur les propriétés rotatoires et spectrales de la trypsine à pH 4,8. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 20. On constate que le pouvoir rotatoire spécifique de la protéine à 395 m μ reste constant en fonction du temps et qu'il est indépendant de la concentration en protéine entre 1 et 10 mg/ml. Les propriétés spectrales ne sont pas davantage affectées. Il semble donc que la polymérisation s'effectue sans aucune modification des structures secondaire et tertiaire de la protéine. Ce résultat indique d'autre part que la trypsine sous forme AH se polymérise de la même façon que sous forme BH.

Nous allons essayer de relier entre eux ces résultats et ceux obtenus par ailleurs concernant l'activité et la conformation de la trypsine. Rappelons schématiquement quel est l'effet du pH sur les différentes propriétés de la trypsine. La conformation de la protéine est modifiée par la protonation, en milieu acide, ou la déprotonation, en milieu alcalin, de deux groupes spécifiques de pK apparents 3,7 et 10,1. Nous verrons que la fixation du substrat par l'enzyme dépend de l'ionisation de ces deux groupements et également de celle d'un groupe carboxyle de pK environ 4,5. La diminution de l'activité enzymatique aux pH acides est liée à la protonation de l'histidine 46 de pK environ 6,5. Enfin, la diminution de la polymérisation de la trypsine de part et d'autre de pH 5,5 pourrait être attribuée à la protonation d'un carboxyle aux pH acides et à la déprotonation de l'histidine du site actif aux pH neutres.

Une interaction intermoléculaire entre ces deux groupements a été antérieurement proposée pour rendre compte de la variation en fonction du pH de la polymérisation de la chymotrypsine ⁸².

Etant donné les résultats obtenus dans cette étude d'après lesquels la fixation d'un inhibiteur compétitif par la trypsine empêche la polymérisation de la protéine, on peut suggérer que le carboxyle de pK 4,5 responsable de la fixation de l'inhibiteur est également responsable de la polymérisation. Ceci revient à dire que seul le monomère est capable de fixer le substrat.

Cette dernière hypothèse a été particulièrement discutée dans le cas de la chymotrypsine ⁸²⁻⁸⁸. D'après Sarfare et al. ⁸⁶, la chymotrypsine se polymérise de la même façon en présence et en absence d'un inhibiteur compétitif, le β phényl-propionate et les auteurs en concluent que les sites de fixation et de polymérisation sont totalement indépendants. Ces résultats paraissent en contradiction avec ceux obtenus dans ce travail. En fait, contrairement à celui de la trypsine, le site de fixation de la chymotrypsine ne comprend pas de groupement carboxyle ; un carboxyle peut donc entrer librement en interaction avec l'histidine active d'une molécule voisine sans que cette liaison affecte la fixation du substrat. Par contre, la fonction catalytique de la chymotrypsine devrait être modifiée si l'histidine active intervient dans le phénomène de polymérisation. D'après Martin et Niemann ⁸³, les différentes formes quaternaires de l'enzyme peuvent se combiner avec le substrat, mais seul le complexe monomère-substrat se décompose avec une vitesse significative. D'autre part, Berezin et al. ⁸⁷ ont montré que les ions borate inhibaient de façon non compétitive l'hydrolyse du paranitrophényl-acétate en abaissant la valeur de la constante d'acylation ; les auteurs ont suggéré que l'acide borique devait former un complexe réversible avec l'histidine du site catalytique. Or, il a été montré dans le cas de la trypsine, que les ions borate se fixaient également sur cet enzyme et qu'ils empêchaient d'autre part sa polymérisation ⁷⁹.

On peut donc suggérer que la polymérisation de la trypsine s'effectue par une liaison entre carboxyle et histidine et qu'elle est inhibée soit par interaction du substrat avec le groupe carboxyle, soit par interaction des ions borate avec l'histidine.

DEUXIEME PARTIE . ETUDE DE LA FIXATION D'INHIBITEURS COMPETITIFS
PAR LES DIFFERENTES FORMES DE LA TRYPSINE ,
ENTRE pH 1,5 ET 12,5 .

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié l'effet du pH sur la fixation non covalente par la trypsine d'inhibiteurs compétitifs de l'enzyme. Le but de cette étude a été d'essayer de répondre à deux questions .

1. La fixation de l'inhibiteur compétitif par la trypsine est-elle affectée par les changements de conformation que subit la trypsine en fonction du pH ? ou encore, y a-t'il une relation directe entre la structure spatiale de la protéine et l'activité de l'enzyme ?

2. La fixation de l'inhibiteur compétitif par la trypsine s'accompagne-t'elle d'une modification de la conformation de la trypsine - et éventuellement d'une modification de la conformation de l'inhibiteur ? ou encore, y a-t'il ajustement induit - et éventuellement réciproque - des conformations des molécules qui entrent en interaction? ^{89,90} .

Les résultats obtenus en milieux neutre, acide et alcalin , et que nous allons exposer maintenant ^{*} , permettent de répondre affirmativement à ces deux questions.

Les conditions générales d'expérience ($\theta = 10$ à 15° et $\mu = 0,3-0,4$) sont les mêmes que celles choisies pour l'étude de la trypsine libre. Les inhibiteurs compétitifs utilisés sont les suivant :

^{*} Une partie de ce travail a fait l'objet d'une publication¹ ; nous ne reviendrons pas ici sur certains résultats expérimentaux et certaines discussions qui y sont exposés en détail.

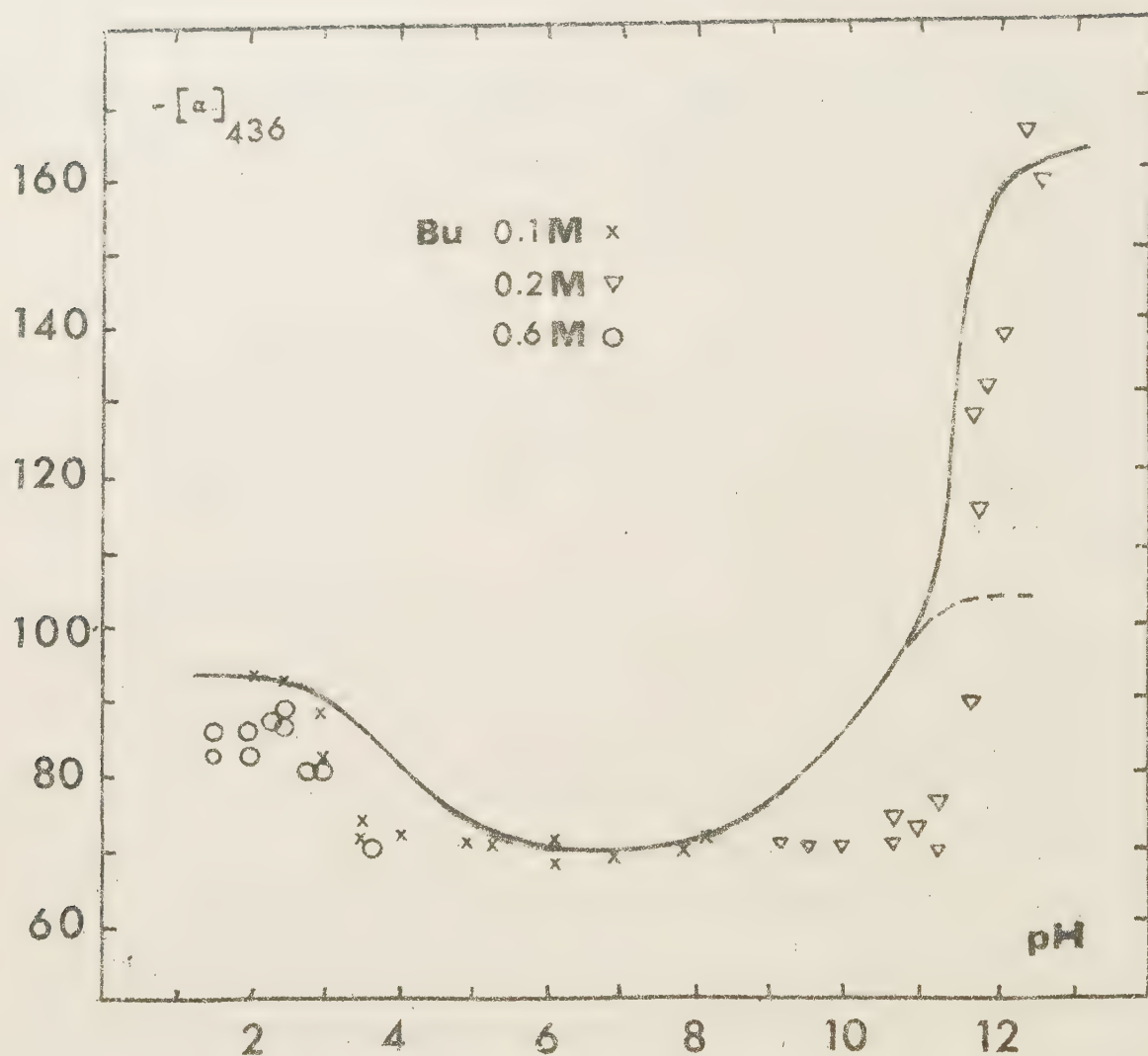
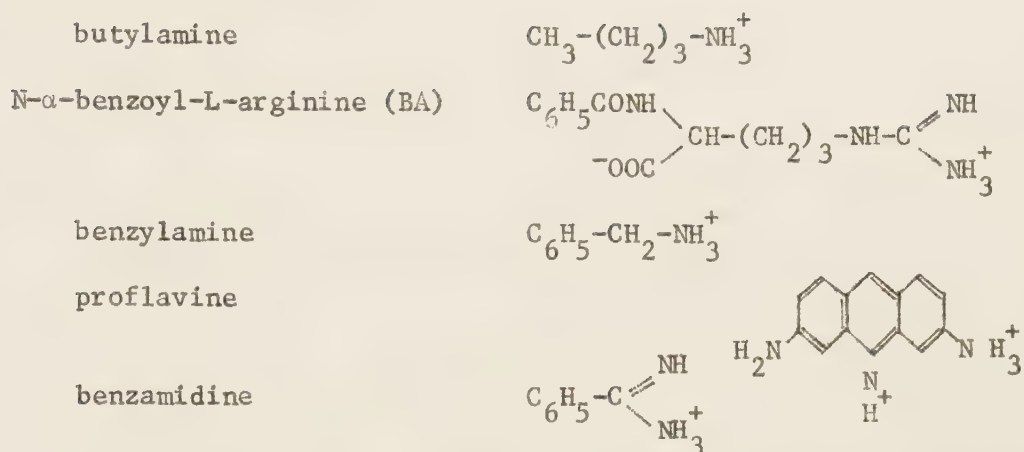


FIGURE 21

Effet du pH sur le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_{436}$ de la trypsine en absence (courbe en tracé plein) et en présence de butylamine (BU) à différentes concentrations (x, ▽, o).



Les valeurs des constantes d'inhibition déterminées à pH neutre ainsi que les valeurs des pK des groupements ionisables de ces inhibiteurs ont été portées sur le tableau 2 (p.14).

I. Etude aux pH neutres, entre pH 5 et 8,5 .

1. Changement de conformation " réel " de l'enzyme .

Entre pH 5 et 8,5, la formation du complexe trypsine-butylamine ne s'accompagne d'aucune modification appréciable du pouvoir rotatoire de la trypsine (fig.21 ; voir également la figure 31) ; dans cette zone de pH, la protéine étant essentiellement sous forme BH, la formation du complexe BH-butylamine n'induit pas de modification significative de la structure de BH.

Par contre, la formation des complexes BH-N- α -benzoyl-L-arginine¹, BH-benzylamine¹ et BH-benzamidine (voir figure 24) s'accompagne d'une diminution de la lévoration de la protéine ; celle-ci est attribuable à un changement de conformation " réel " de la protéine.

On a porté sur la figure 22 les valeurs de la variation relative du pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine sous forme de complexe enzyme-inhibiteur par rapport au pouvoir rotatoire de l'enzyme libre. On constate que la modification du pouvoir rotatoire de BH induite par la fixation de l'inhibiteur est d'autant plus grande que son affinité pour l'enzyme est plus élevée.

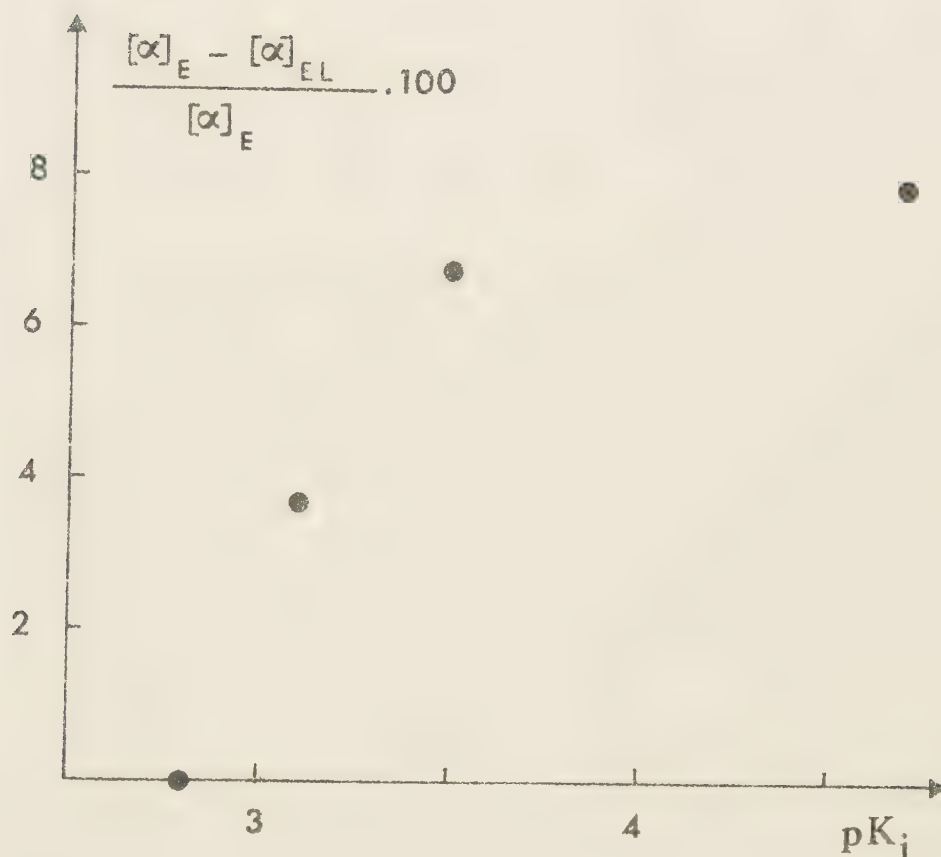


FIGURE 22

Variation relative du pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine sous forme de complexe enzyme-inhibiteur compétitif par-rapport au pouvoir rotatoire de l'enzyme libre. On a porté en abscisses les constantes d'inhibition de la butylamine, de la N- α -benzoyl-L-arginine, de la benzylamine et de la benzamidine.

Conditions d'expérience : pH 6-8 - $\theta = 10^\circ$ - $\mu = 0,3$.

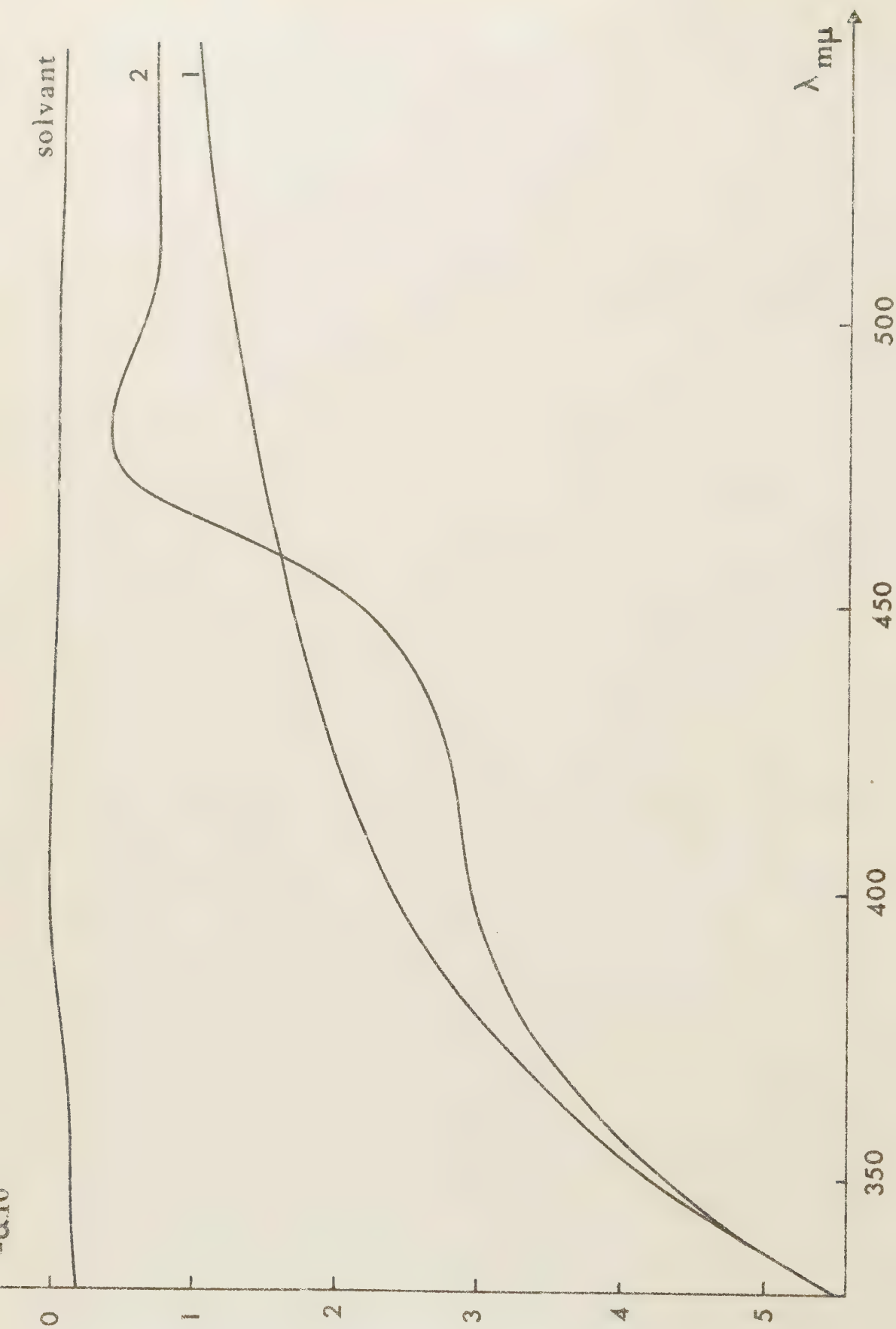


FIGURE 23

Dispersion rotatoires de solutions de trypsine.

Courbe 1 : en absence de proflavine - Courbe 2 : en présence de proflavine $8,1 \cdot 10^{-5}$ M.
 Conditions expérimentales : $\Theta = 10^\circ$ - $\mu = 0,3$ - pH = 5,7 - (enzyme) = $4,8 \text{ mg/ml} = 2 \cdot 10^{-4}$ M

Les résultats obtenus par spectrophotométrie confirment ceux obtenus par polarimétrie ; on observe en effet que le spectre du complexe trypsine-butylamine est le même que celui de la trypsine libre (voir figure 36) alors que le spectre du complexe trypsine-benzamidine en est légèrement différent.

2. Modification de l'inhibiteur.

La différence spectrale que nous venons de signaler a été également observée par East et Trowbridge¹⁴ ; les auteurs suggèrent que la formation du complexe trypsine-benzamidine modifie non seulement la structure de l'enzyme, mais également celle de l'inhibiteur. Il est en effet plausible et même justifié de penser que la fixation par la trypsine d'une petite molécule modifie l'environnement de celle-ci et donc ses propriétés spectrales.

Les expériences effectuées en utilisant la proflavine comme inhibiteur étayent cette hypothèse. Sur la figure 23 sont représentées les courbes de dispersion rotatoire de la trypsine obtenues en absence et en présence de proflavine. On constate la présence dans la zone d'absorption du colorant d'un effet Cotton positif centré à 458 mμ . Le maximum positif est situé à 478 mμ , le minimum négatif à 428 mμ ; à ces longueurs d'onde, le pouvoir rotatoire molaire de la proflavine complexée a les valeurs suivantes : $[M]_{478} = + 320^\circ$ et $[M]_{428} = - 250^\circ$. Rappelons que la proflavine libre a un pouvoir rotatoire nul ; c'est donc la fixation de l'inhibiteur sur la trypsine qui induit une certaine asymétrie dans la molécule et qui la rend optiquement active. Le même résultat a été obtenu par Foster dans le cas de la chymotrypsine⁹¹.

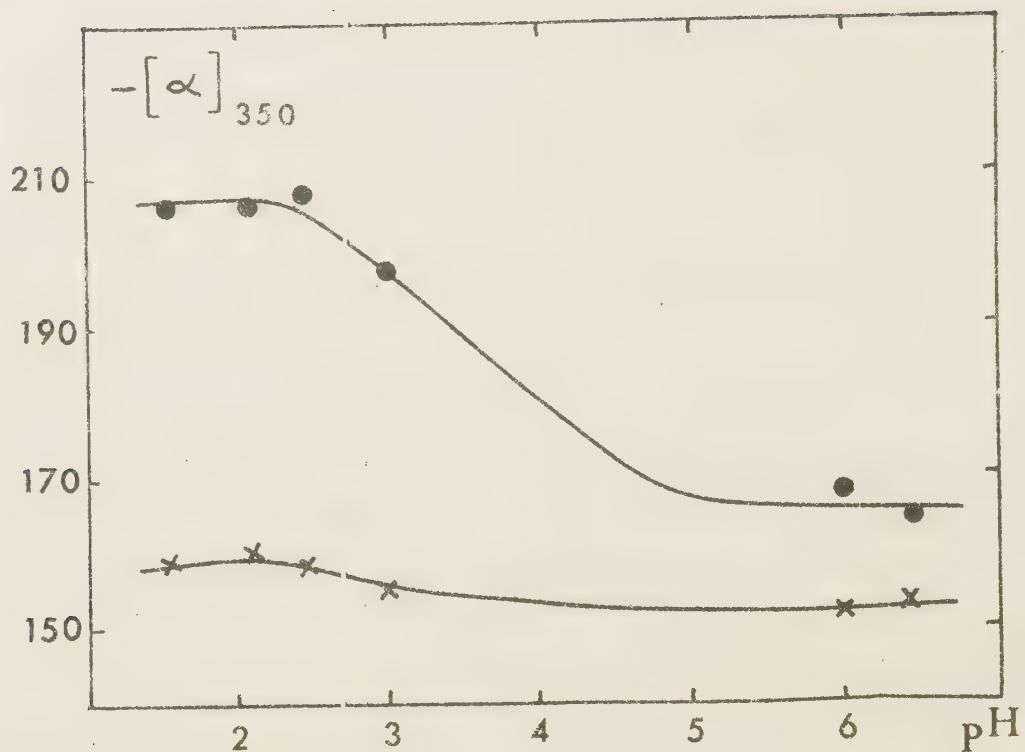


FIGURE 24

Variations comparées en fonction du pH du pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine libre (●) et du complexe trypsine-benzamidine (x).

Conditions expérimentales : $\theta = 15^\circ$ - $\mu = 0,3$.

II. Etude aux pH acides.

1. Résultats expérimentaux.

Pouvoir rotatoire .

Contrairement à celui de la trypsine libre, le pouvoir rotatoire spécifique du complexe trypsine-benzamidine conserve la même valeur entre pH 1,5 et 7 (fig. 24); un résultat identique est obtenu lors de la formation des complexes trypsine-butylamine, trypsine-BA et trypsine-benzylamine¹. Dans des conditions où leur hydrolyse est négligeable, nous avons pu également examiner l'effet de deux vrais substrats, la N- α -benzoyl-L-arginine amide (BAA) et le N- α -benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) ; nous avons observé que la lévoration de la trypsine à 395 m μ diminuait de 20° environ en présence de BAA $6,6 \cdot 10^{-2}$ M à pH 4 et de 14° en présence de BAEE $5 \cdot 10^{-3}$ M à pH 3,2. (Une diminution du pouvoir rotatoire de la chymotrypsine a été également observée en milieu acide en présence d'acétyl tyrosine éthyl ester (ATEE) ou de diisopropylfluorophosphate (DFP)^{93,94}).

Tout se passe comme si l'inhibiteur (ou le substrat) ne peut se fixer que sur les formes "b" de la trypsine (voir schéma 1, p.20) ; la formation du complexe provoque donc un déplacement d'équilibre des formes "a" vers les formes "b".

Ce phénomène entraîne deux conséquences que l'on peut mettre en évidence expérimentalement. Nous avons vu en effet que dans le cas de la trypsine libre, la forme "a" prépondérante est celle dont le carboxyle de conformation de pK apparent 3,7 est protoné, alors que la forme "b" prépondérante est celle dont ce même carboxyle est ionisé ; le déplacement d'équilibre de "a" vers "b" en présence d'inhibiteur va ainsi entraîner l'augmentation du nombre des molécules de trypsine dont le carboxyle de conformation est ionisé. La fixation d'inhibiteur par la trypsine aux pH acides doit donc s'accompagner d'une libération de protons dans le milieu; elle doit en outre s'effectuer avec une affinité d'autant plus faible que le pH sera plus bas.

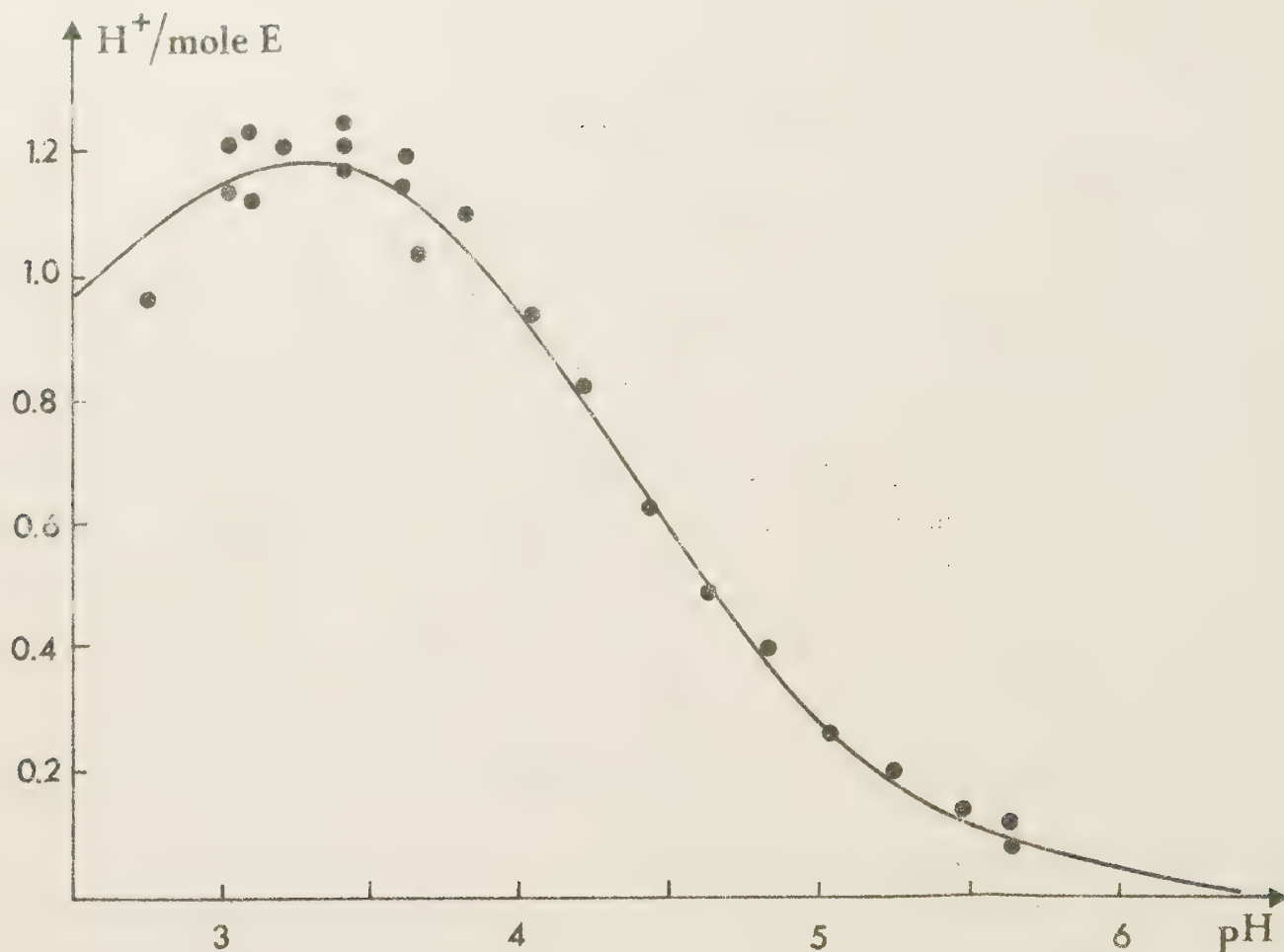


FIGURE 25

Variation du nombre de protons libérés par molécule d'enzyme lors de l'interaction trypsine-benzamidine entre pH 3 et 5,5.

Conditions expérimentales : $\theta = 15^\circ$ - $\mu = 0,3$ - (enzyme) = $8,9 \cdot 10^{-5} M$
(benzamidine) = $1,1 \cdot 10^{-2} M$.

Le rapport H^+ libéré/molécule d'enzyme est calculé en admettant que 83 % des molécules de trypsine ont un site actif (dosage par le p-nitrophényl-acétate) (92)

La courbe est calculée (voir texte).

Titration potentiométrique.

L'addition de benzamidine en quantité saturante à une solution non tamponnée de trypsine amenée au même pH provoque effectivement une acidification du milieu ; la variation du nombre de protons libérés par molécule de trypsine en fonction du pH est représentée sur la figure 25.

Les deux remarques suivantes indiquent que le carboxyle de conformation de pK apparent 3,7 n'est pas seul à être impliqué :

- entre pH 3 et 3,75, il y a plus d'un proton libéré par mole d'enzyme ;
- on observe une libération de protons déjà à partir de pH 6.

Il est logique de penser que la libération de protons provient non seulement du carboxyle de conformation mais également du carboxyle qui interagit sous sa forme ionisée avec la charge positive de l'inhibiteur et que nous appellerons carboxyle de fixation. Le pK de ce carboxyle dans l'enzyme libre doit avoir une valeur de 4,5 environ d'après la courbe de titrage de la figure 25.

La libération de protons par la trypsine aux pH acides lors de la formation d'un complexe non covalent avec un inhibiteur compétitif a été également observée dans le cas de la benzylamine¹ ; le même résultat a été obtenu lors de la formation d'un acylenzyme entre la trypsine et des substrats comme le BAAE ou le N-p-toluènesulfonyl-L-arginine méthylester (TAME).

Constantes apparentes de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

La formation du complexe enzyme-inhibiteur en milieu acide s'accompagnant d'une diminution de la lévrotation de l'enzyme et d'une libération de protons, on a pu étudier la variation de la constante apparente de dissociation du complexe, c'est-à-dire la variation de $(L)_{1/2}$, en fonction du pH. Deux exemples de ces méthodes de détermination de $(L)_{1/2}$, soit par polarimétrie, soit par potentiométrie, sont donnés sur les figures 26 et 27 : sur la figure 26 est représentée la variation du pouvoir rotatoire de la trypsine sous l'effet de l'addition de benza-

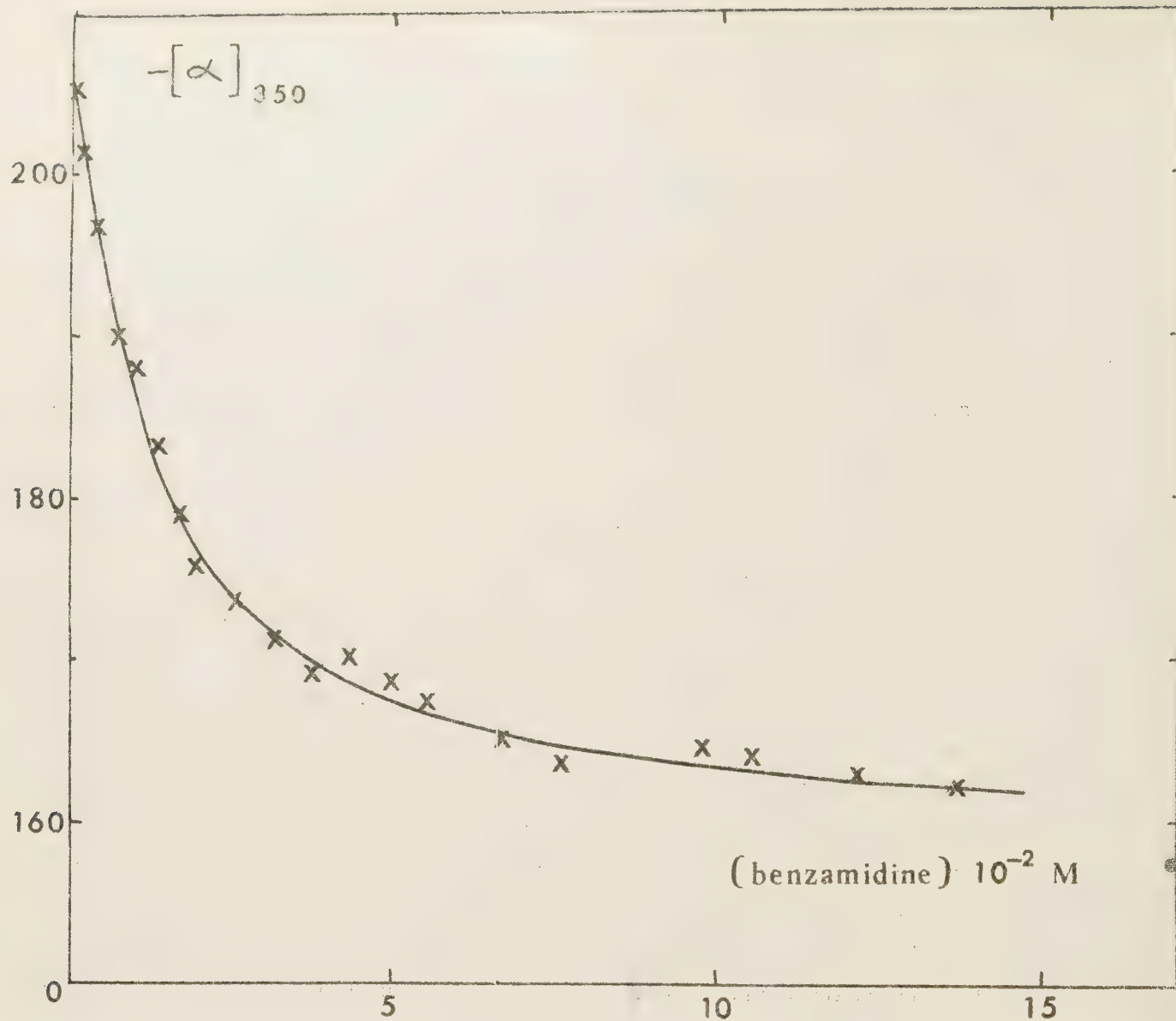


FIGURE 26

Variation du pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine en fonction de la concentration molaire en benzamidine.

Conditions expérimentales : pH 1,5 - $\theta = 15^\circ$ - $\mu = 0,3$.

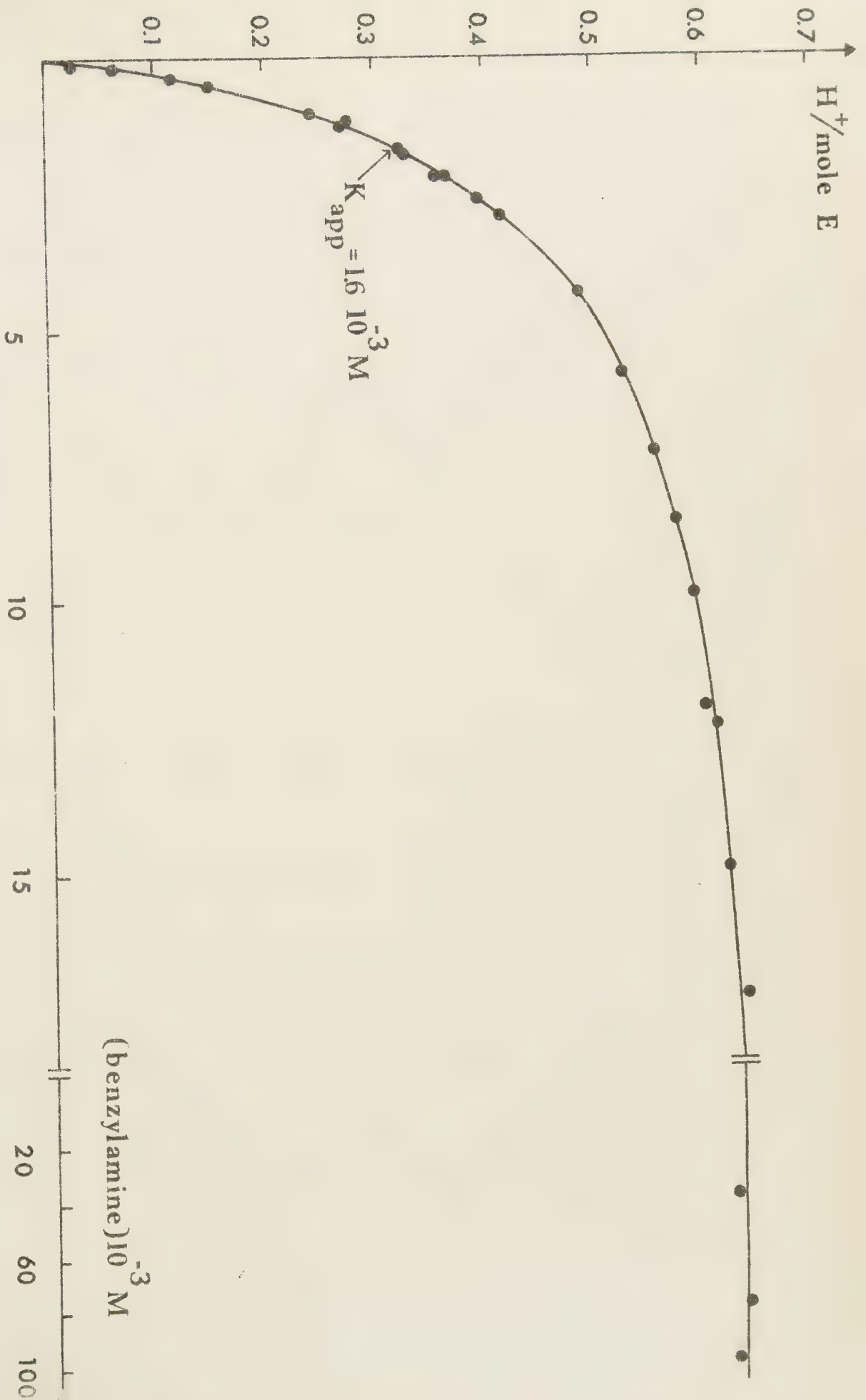
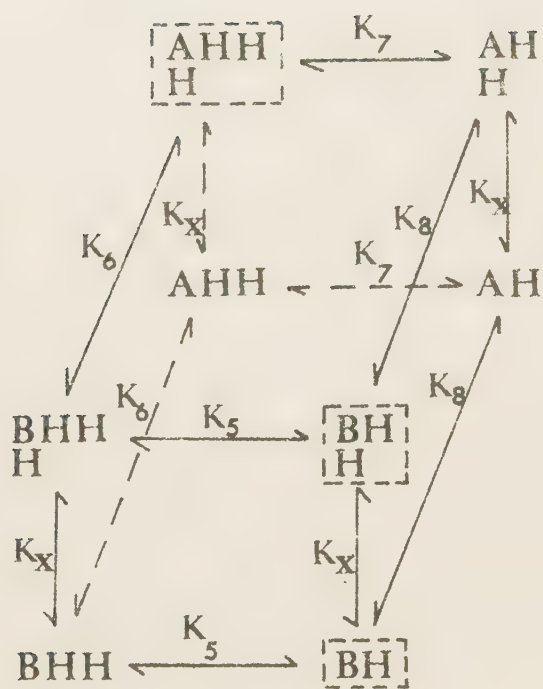
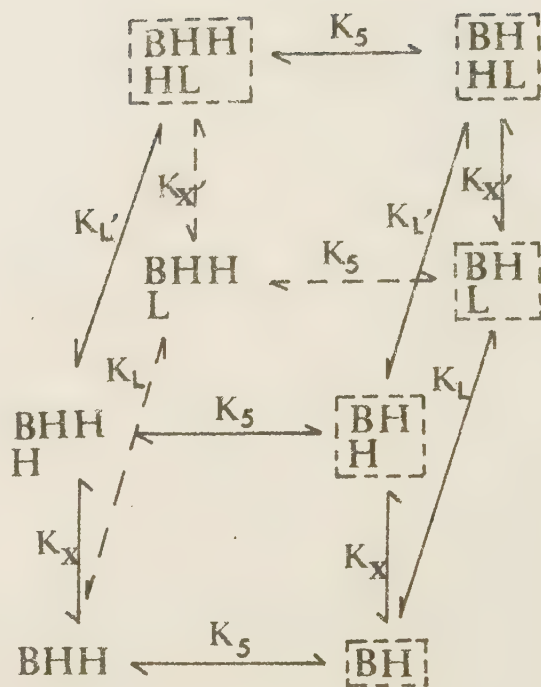


FIGURE 27 : Variation du nombre de protons libérés par molécule d'enzyme en fonction de la concentration molaire en benzylamine.
Conditions expérimentales : pH 4,1 - $\Theta = 12^\circ$ - $\mu = 0,3$.



a



b

SCHEMA 5

midine, à pH 1,5 ; sur la figure 27 est représentée la variation du nombre de protons libérés par molécule d'enzyme sous l'effet de l'addition de benzylamine, à pH 4,1.

(Ces variations polarimétriques et potentiométriques sont dues effectivement à la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme et non à la variation de la force ionique du milieu. Il a été montré d'autre part par Inagami ¹¹ que l'association de la trypsine avec des inhibiteurs compétitifs chargés positivement, comme la benzylamine, était indépendante de la force ionique ; Béchet et al. ⁹⁵ ont mis en évidence par ailleurs qu'une variation de force ionique du milieu affectait la vitesse maximale V_m mais non la constante de Michaelis K_m d'une réaction d'hydrolyse catalysée par la trypsine).

Les valeurs de $(L)_{1/2}$ déterminées à quelques pH dans le cas des complexes trypsine-benzamidine et trypsine-benzylamine sont indiquées sur le tableau 4.

On constate que l'affinité de la benzamidine et de la benzylamine pour la trypsine diminue considérablement quand on abaisse le pH. Cette baisse d'affinité doit être liée non seulement à la protonation du carboxyle de conformation mais aussi à celle du carboxyle de fixation.

Les valeurs du pK apparent de dissociation, c'est-à-dire celles de $-\log (L)_{1/2}$ sont indiquées sur les figures 28 et 29.

2. Schéma théorique.

Les relations d'équilibre existant entre un inhibiteur compétitif et les différentes formes de trypsine peuvent être représentées par les schémas 5.

Par souci de clarté, nous avons dessiné deux schémas côte à côte. Le premier (a) est relatif à l'enzyme libre ; on a ajouté au schéma 1 donné précédemment (p.20) quatre entités tryptiques supplémentaires ayant le carboxyle de fixation ionisé ou non. Le deuxième (b) est relatif à l'enzyme en présence d'inhibiteur. (Les deux lettres H situées sur la droite des lettres A et B représentent respectivement le carboxyle de

TABLEAU 4.

Valeurs des constantes apparentes de dissociation du complexe
trypsine-benzamidine déterminées à quelques pH par trois méthodes
différentes.

pH	$(L)_{1/2}^M$	Méthode
8,0	$2,7 \cdot 10^{-5}$	Inhibition de l'hydrolyse trypsique
4,5	$5,3 \cdot 10^{-5}$	Titration potentiométrique
4,0	$1,1 \cdot 10^{-4}$	" "
3,5	$5,3 \cdot 10^{-4}$	" "
3,1	$1,6 \cdot 10^{-3}$	" "
3,0	$2,6 \cdot 10^{-3}$	Titration polarimétrique
2,4	$1,6 \cdot 10^{-2}$	" "
2,1	$1,9 \cdot 10^{-2}$	" "
1,5	$1,3 \cdot 10^{-2}$	" "

Valeurs des constantes apparentes de dissociation du complexe
trypsine-benzylamine déterminées à quelques pH par trois méthodes
différentes.

pH	$(L)_{1/2}^M$	Méthode
6,0	$3,3 \cdot 10^{-4}$	Inhibition de l'hydrolyse trypsique
4,1	$1,6 \cdot 10^{-3}$	Titration potentiométrique
3,5	$5,5 \cdot 10^{-3}$	Titration polarimétrique
2,5	$6,9 \cdot 10^{-2}$	" "
2,0	$5,7 \cdot 10^{-2}$	" "

conformation et le groupe de pK apparent 10,1, à l'état protoné. Dans la zone de pH envisagée ici, entre pH 1,5 et 7, ce dernier groupement est toujours protoné ; un seul H à côté de A ou de B signifie donc que le carboxyle de conformation est à l'état ionisé. La lettre H située sous les lettres A et B indique que le carboxyle de fixation est protoné ; son absence signifie que ce carboxyle est ionisé. La lettre L représente le ligand, ici l'inhibiteur compétitif).

Dans l'établissement des schémas 5, on a fait un certain nombre d'hypothèses :

- seules les formes "b" de l'enzyme sont capables de fixer l'inhibiteur ; les résultats obtenus par polarimétrie indiquent en effet que les formes "a" n'existent pas en présence d'une concentration saturante en inhibiteur ;
- les carboxyles de conformation et de fixation s'ionisent indépendamment l'un de l'autre ;
- l'affinité de l'inhibiteur pour les formes "b" est indépendante de l'état d'ionisation du carboxyle de conformation ; elle dépend bien entendu de l'état d'ionisation du carboxyle de fixation. On appellera K_L la constante de dissociation des complexes BH et BHH et K_L , la constante de dissociation des complexes BH et BHH ; on appellera K_x et K_x , les constantes d'ionisation du carboxyle de fixation dans l'enzyme libre et dans le complexe enzyme-inhibiteur.

Variation de la constante apparente de dissociation $(L)_{1/2}$ du complexe trypsine-inhibiteur en fonction du pH. Comme nous l'avons vu dans l'exposé des méthodes, on peut écrire que $(L) = (L)_{1/2}$ lorsqu'il y a dans le milieu autant de molécules de trypsine à l'état libre que de molécules de trypsine ayant fixé le ligand.

$$(L)_{1/2} = \frac{(BH) + \left(\frac{BH}{H}\right) + (BHH) + \left(\frac{BHH}{H}\right) + (AH) + \left(\frac{AH}{H}\right) + (AHH) + \left(\frac{AHH}{H}\right)}{\left(\frac{BH}{L}\right) + \left(\frac{BH}{HL}\right) + \left(\frac{BHH}{L}\right) + \left(\frac{BHH}{HL}\right)}$$

En remplaçant les concentrations en protéine par les constantes d'équilibre, on obtient :

$$(L)_{1/2} = \frac{1 + \frac{(H)}{K_x} + \frac{(H)}{K_5} + \frac{(H)^2}{K_x K_5} + \frac{1}{K_8} + \frac{(H)}{K_8 K_x} + \frac{(H)}{K_8 K_7} + \frac{(H)^2}{K_8 K_x K_7}}{\frac{1}{K_L} + \frac{(H)}{K_L K_{x'}} + \frac{(H)}{K_L K_5} + \frac{(H)^2}{K_L K_{x'} K_5}}$$

Variation en fonction du pH de la fraction $(f)_f$ de molécules de trypsine dont le carboxyle de fixation est ionisé en absence et en présence de ligand à concentration saturante .

a) en absence de ligand

$$(f)_f = \frac{(BH) + (BHH) + (AH) + (AHH)}{(BH) + (BHH) + (AH) + (AHH) + \binom{BH}{H} + \binom{BHH}{H} + \binom{AH}{H} + \binom{AHH}{H}}$$

$$= \frac{1}{1 + \frac{\frac{(H)}{K_x} + \frac{(H)^2}{K_x K_5} + \frac{(H)}{K_8 K_x} + \frac{(H)^2}{K_8 K_x K_7}}{1 + \frac{(H)}{K_5} + \frac{1}{K_8} + \frac{(H)}{K_7 K_8}}} = \frac{1}{1 + \frac{(H)}{K_x}}$$

b) en présence de ligand à concentration saturante :

$$(f_L)_f = \frac{\binom{BH}{L} + \binom{BHH}{L}}{\binom{BH}{L} + \binom{BHH}{L} + \binom{BH}{HL} + \binom{BHH}{HL}}$$

$$= \frac{1}{1 + \frac{\frac{(H)}{K_L K_{x'}} + \frac{(H)^2}{K_L K_{x'} K_5}}{\frac{1}{K_L} + \frac{(H)}{K_L K_5}}} = \frac{1}{1 + \frac{(H)}{K_{x'}}}$$

La différence $(f_L - f)_f$ est égale à la fraction de molécules de trypsine dont le carboxyle de fixation s'ionise lors de l'addition d'une quantité saturante de ligand.

Variation en fonction du pH de la fraction $(f)_c$ de molécules de trypsine dont le carboxyle de conformation est ionisé en absence et en présence de ligand à concentration saturante.

a) en absence de ligand :

$$\begin{aligned}
 (f)_c &= \frac{(BH) + \left(\frac{BH}{H}\right) + (AH) + \left(\frac{AH}{H}\right)}{(BH) + \left(\frac{BH}{H}\right) + (AH) + \left(\frac{AH}{H}\right) + (BHH) + \left(\frac{BHH}{H}\right) + (AHH) + \left(\frac{AHH}{H}\right)} \\
 &= \frac{1}{1 + \frac{\frac{(H)}{K_5} + \frac{(H)^2}{K_x K_5}}{1 + \frac{(H)}{K_x} + \frac{1}{K_8} + \frac{(H)}{K_8 K_x}}} \\
 &= \frac{1}{1 + \frac{(H)}{K_7 K_8} \frac{\frac{K_7 K_8}{K_5} + \frac{(H) K_7 K_8}{K_x K_5} + 1 + \frac{(H)}{K_x}}{1 + \frac{(H)}{K_x} + \frac{1}{K_8} + \frac{(H)}{K_8 K_x}}}
 \end{aligned}$$

b) en présence de ligand à concentration saturante :

$$\begin{aligned}
 (f_L)_c &= \frac{\left(\frac{BH}{L}\right) + \left(\frac{BH}{HL}\right)}{\left(\frac{BH}{L}\right) + \left(\frac{BH}{HL}\right) + \left(\frac{BHH}{L}\right) + \left(\frac{BHH}{HL}\right)} \\
 &= \frac{1}{1 + \frac{\frac{(H)}{K_L K_5} + \frac{(H)^2}{K_L K_x K_5}}{\frac{1}{K_L} + \frac{(H)}{K_L K_x}}} = \frac{1}{1 + \frac{(H)}{K_5}}
 \end{aligned}$$

La différence $(f_L - f)_c$ est égale à la fraction de molécules de trypsine dont le carboxyle de conformation s'ionise lors de l'addition d'une quantité saturante de ligand.

La quantité totale de protons libérés par mole de trypsine lors de l'addition d'une quantité saturante d'inhibiteur, H^+ /mole, sera donc égale à la somme $(f_L - f)_f + (f_L - f)_c$.

3. Application des données théoriques aux résultats expérimentaux obtenus avec la benzamidine.

Valeurs calculées de $(L)_{1/2}$ et de H^+ /mole. Choix des constantes K.

Les valeurs de K_5 , K_6 , K_7 et K_8 sont celles qui ont été adoptées précédemment lors de l'étude de l'effet du pH sur le pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine : $K_5 = 2 \cdot 10^{-2}$, $K_6 = 10^{-2}$, $K_7 = 10^{-5}$ et $K_8 = 2 \cdot 10^1$. La constante d'ionisation K_x du carboxyle de fixation dans l'enzyme libre est, nous l'avons vu, déterminée d'après titrage potentiométrique ; sa valeur est de $3,2 \cdot 10^{-5}$ ($pK_x = 4,5$).

La constante de dissociation K_L est égale à la constante d'inhibition déterminée à pH neutre lorsque le carboxyle de fixation de l'enzyme est ionisé ; sa valeur est de $2,7.10^{-5}$ M.

Enfin, les valeurs de K_L , et de K_x , sont inconnues ; ce sont respectivement la constante de dissociation du complexe enzyme-ligand lorsque le carboxyle de fixation de l'enzyme est protoné et la constante d'ionisation du carboxyle de fixation dans le complexe enzyme-ligand. Leurs valeurs cependant ne sont pas indépendantes puisqu'on a la relation $K_x, K_L = K_x K_L$. La valeur de K_x , qui rend le mieux compte des résultats expérimentaux (fig. 25 et 28) est égale à $6,3.10^{-4}$ ($pK_x = 3,2$) ; il lui correspond une valeur de K_L , égale à $5,4.10^{-4}$ M.

A l'aide de ces valeurs des différentes constantes, on peut calculer la variation en fonction du pH des valeurs de $(L)_{1/2}$ et de H^+ /mole, en utilisant les relations données ci-dessus. Les courbes calculées sont indiquées sur les figures 28 et 25. L'accord avec les points expérimentaux est satisfaisant.

Des résultats semblables peuvent être obtenus dans le cas des autres inhibiteurs compétitifs de la trypsine ; dans le schéma 5, seules les constantes K_L, K_L , et K_x , seront modifiées. Dans le cas de la benzylamine, les valeurs de K_L , et de K_x , qui rendent le mieux compte des résultats expérimentaux (fig. 29) sont égales respectivement à $4,2.10^{-3}$ M et à 4.10^{-4} , K_L étant égale à $3,3.10^{-4}$ M.

On constate cependant, dans le cas de la benzylamine comme dans celui de la benzamidine, qu'à pH 1,5 l'affinité de l'inhibiteur compétitif pour la trypsine est "anormalement" élevée ; elle est en effet supérieure à la valeur obtenue à pH 2,5 et 2. Ce phénomène reste inexpliqué. La seule modification que subit la trypsine à pH inférieur à 2 est, nous l'avons vu, une perturbation spectrale que l'on peut attribuer à la protonation du noyau indole d'un tryptophane de la molécule ; cette protonation pourrait favoriser la fixation de l'inhibiteur sur la trypsine.

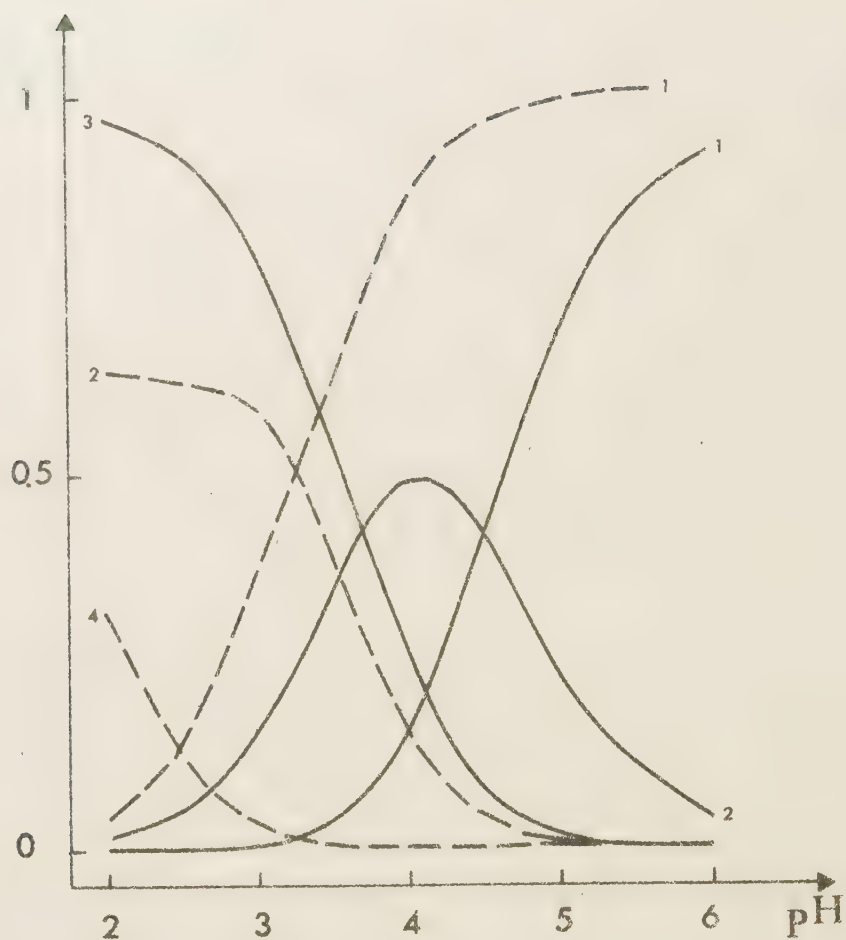


FIGURE 30

Les courbes sont calculées ; elles représentent la variation, en fonction du pH, des fractions de molécules de trypsine sous ses principales formes.

Les courbes en trait plein sont relatives à l'enzyme libre ; celles en tirets sont relatives à l'enzyme en présence d'une concentration saturante de ligand (benzamidine). Les chiffres désignent les entités moléculaires.

1: BH et BH ; 2: BH et BH ; 3: AHH ; 4: BHH
L H HL H HL

La fixation de la benzamidine par la trypsine protège donc celle-ci contre la transconformation acide que l'enzyme subit lorsqu'il est libre, puisque le complexe enzyme-inhibiteur conserve la structure de "b" jusqu'à pH 2 (et même jusqu'à pH 1,5). La variation en fonction du pH de la fraction de molécules de trypsine sous ses différentes formes en absence et en présence d'une concentration saturante de ligand est représentée sur la figure 30. (On a représenté seulement les formes qui existent en quantités non négligeables. Les résultats obtenus dans le cas de la trypsine libre sont les mêmes que ceux qui ont été donnés dans la première partie de l'exposé (voir figure 2) ; on voit que la forme "a" essentielle est la molécule AHH dont les deux carboxyles de conformation et de fixation sont protonés ; sous forme "b" existent les molécules BH et BH , dont le carboxyle de conformation est ionisé. Le complexe trypsine-inhibiteur est uniquement sous forme "b" ; au-dessus et jusqu'à pH 4, la molécule BH est prépondérante ; entre pH 4 et 3, à côté de BH , on trouve BH ; enfin, aux pH inférieurs à 3, la concentration en molécules BHH commence à augmenter, aux dépens principalement de BH . Il est à noter que la concentration de BHH est d'après cette analyse théorique tout à fait négligeable. Sur les schémas 5, on a encadré les symboles relatifs aux molécules dont la concentration est importante dans une zone de pH donné.

Cette fixation préférentielle de l'inhibiteur sur les formes BH , BH et BHH de la trypsine peut permettre de rendre compte des résultats de la thermodénaturation. Nous avons vu dans la première partie de l'exposé, qu'à pH 2,1, la température de demi-transition thermique du complexe trypsine-benzylamine était inférieure à celle de la trypsine libre (voir figure 14). Or, à ce pH, le complexe est essentiellement sous forme BH et BHH ; si la molécule BH est plus stable vis-à-vis de la thermodénaturation que AHH ($K_T = 2 \cdot 10^1 K_T''$), par contre la molécule BHH est, elle, beaucoup moins stable ($K_T'' = 10^2 K_T$). La présence de molécules de trypsine sous cette dernière forme BHH , même en proportion relativement faible, peut donc provoquer l'abaissement de la température de demi-transition

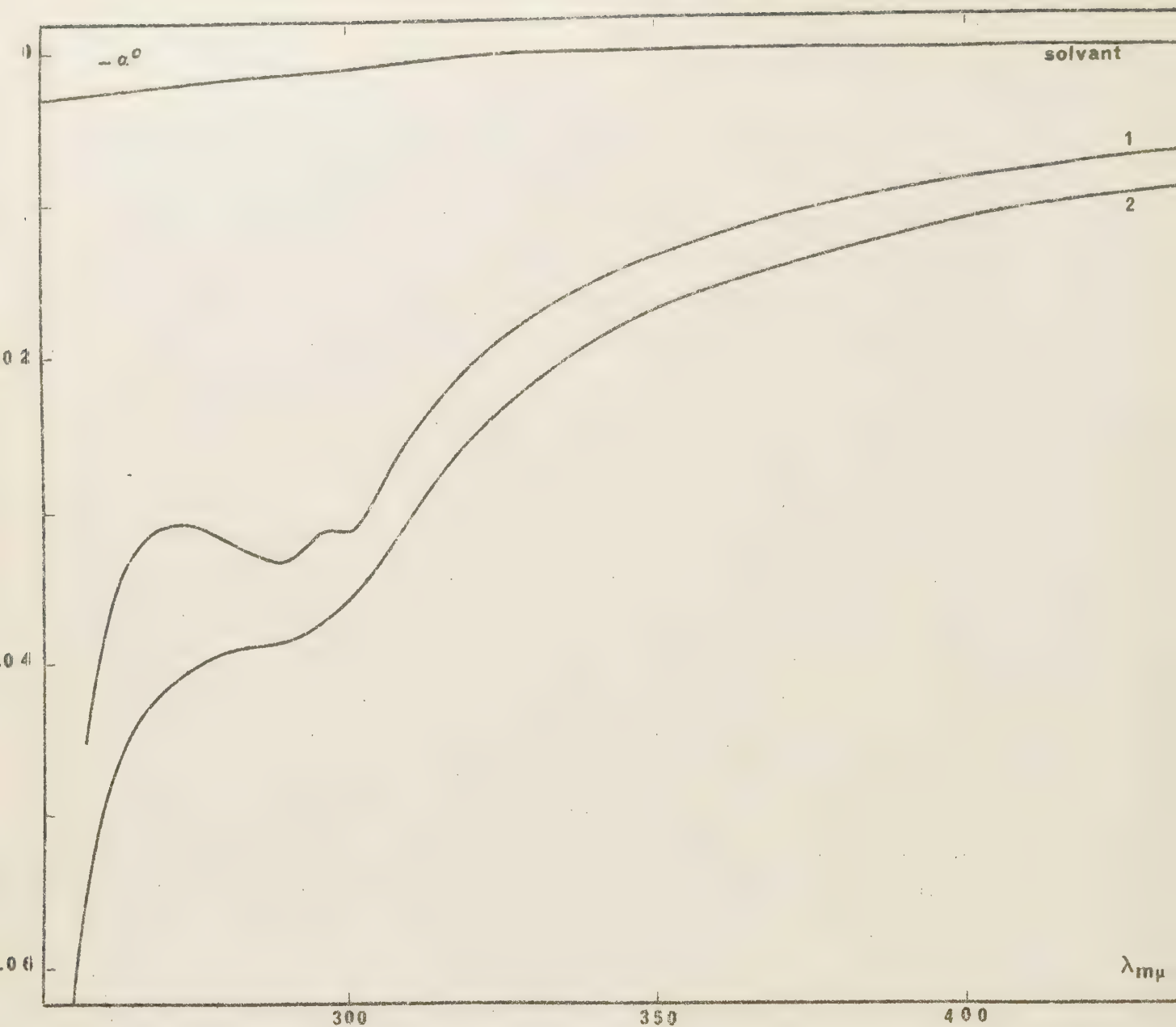


FIGURE 31

Dispersions rotatoires de solutions de trypsine.

courbe 1 : enzyme libre à pH 6,85
 complexe enzyme-butylamine à pH 6,85
 complexe enzyme-butylamine à pH 10,45
 courbe 2 : enzyme libre à pH 10,45

Conditions expérimentales : $\theta = 11^\circ$ - $\mu = 0,3$ - (enzyme) = 0,8mg/ml
 = $3,4 \cdot 10^{-5}$ M - (butylamine) = $8,5 \cdot 10^{-2}$ M - trajet optique = 0,1 dm.

observée expérimentalement. On devrait par contre observer une augmentation de la température de demi-transition par rapport à celle de l'enzyme libre aux pH plus élevés, lorsque la proportion de molécules de trypsine sous forme $\frac{BH}{HL}$ et $\frac{BH}{L}$ augmente aux dépens de $\frac{BHH}{HL}$.

III. Etude aux pH alcalins.

La fixation par la trypsine des inhibiteurs compétitifs peut être analysée de la même façon que précédemment puisque nous avons vu que l'enzyme libre subit en milieu alcalin une modification de conformation semblable à celle qu'il subit en milieu acide. Le schéma sera cependant plus simple puisque le carboxyle de fixation reste ionisé dans toute cette zone de pH ; la fixation par la trypsine de l'inhibiteur devrait donc dépendre seulement de la protonation du groupement de pK apparent 10,1.

1. Résultats expérimentaux.

Propriétés rotatoires.

De même qu'en milieu acide et contrairement à ce qui se passe lorsque l'enzyme est libre, le pouvoir rotatoire du complexe enzyme-inhibiteur reste constant en milieu alcalin entre pH 7 et 11,5 (voir la figure 21)*. Un exemple en est donné par les courbes de dispersion rotatoire de la trypsine obtenues en absence et en présence d'une concentration saturante en butylamine, à pH 6,85 et 10,45 ; ces courbes sont représentées sur la figure 31.

* Entre pH 11,5 et 12,5, la lévoration de la trypsine en présence de butylamine diminue, de façon importante et variable selon le pH, mais n'atteint pas la valeur du pouvoir rotatoire de la protéine à pH neutre (fig. 21). Ce résultat doit être lié au fait que dans cette zone de pH, la trypsine subit des changements de structure irréversibles.

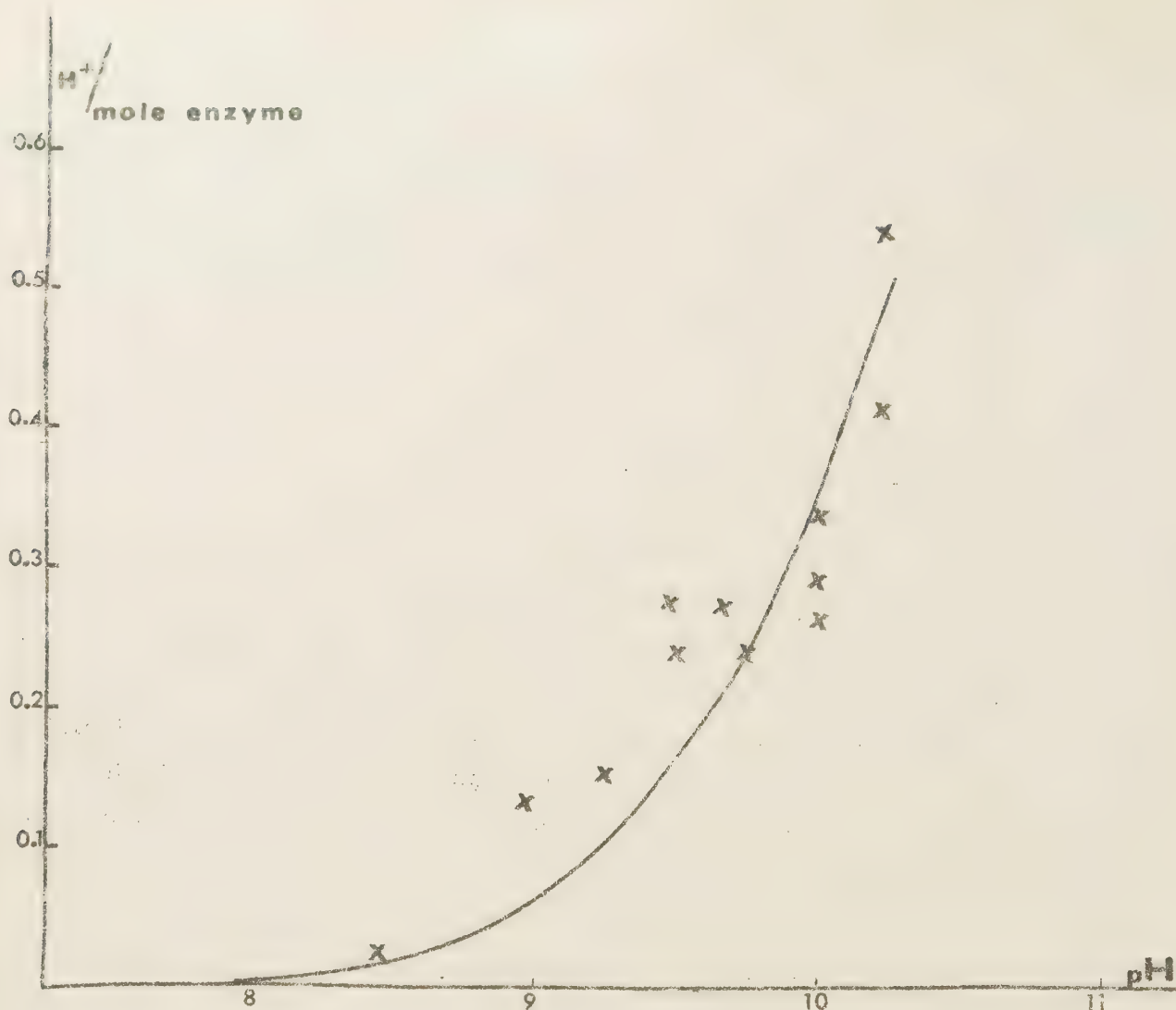


FIGURE 32

Variation du nombre de protons absorbés par molécule d'enzyme lors de l'interaction trypsine-benzamidine entre pH 8,5 et 10,2.

Conditions expérimentales : $\theta = 15^\circ$ - $\mu = 0,3$ - (enzyme) = 10^{-4} M - (benzamidine) = $7,5 \cdot 10^{-4}$ M. Une mesure témoin, sans trypsine, est faite aux pH très élevés où la benzamidine commence à s'ioniser.

Le rapport H^+ absorbé/molécule d'enzyme est calculé en admettant que 83 % des molécules de trypsine ont un site actif (dosage par le p.nitrophényl acétate) (92).

D'après les résultats obtenus, il semble évident qu'entre pH 7 et 11,5 l'inhibiteur ne puisse se fixer que sur les formes "b" et non sur les formes "c" de l'enzyme (voir schéma 1, p.20). Nous avons vu que dans l'enzyme libre, la forme "b" prépondérante est celle dont le groupement de pK apparent 10,1 est protoné et que la forme "c" prépondérante est celle dont le même groupement de pK apparent 10,1 est ionisé. La formation d'un complexe entre l'inhibiteur et les formes "b" de la trypsine doit donc s'accompagner d'une absorption de protons par la protéine ; elle doit s'effectuer d'autre part avec une affinité d'autant plus faible que le pH sera plus élevé .

Titration potentiométrique.

L'addition d'une quantité saturante de benzamidine à une solution de trypsine amenée au même pH entraîne en effet une alcalinisation du milieu. Le titrage du nombre de protons absorbés par mole de trypsine a été effectué à quelques pH et les valeurs obtenues sont indiquées sur la figure 32.

La précision est cependant faible dans cette zone de pH et il est difficile pour cette raison de déduire des résultats expérimentaux la valeur du pK du groupement qui fixe un proton lors de la formation du complexe enzyme-inhibiteur. Par analogie avec les résultats obtenus en milieu acide, il n'est cependant pas déraisonnable de penser qu'il s'agit du groupement de pK apparent 10,1 responsable de la transconformation alcaline de la trypsine libre.

Constante de dissociation du complexe trypsine-benzamidine à pH 10,9.

Nous verrons que la formation du complexe trypsine-butylamine en milieu alcalin s'accompagne d'une diminution d'absorption que l'on peut attribuer au masquage de tyrosines de la protéine (voir la figure 36). La modification de l'absorbance de la trypsine lors de la formation du complexe trypsine-inhibiteur nous a permis de mesurer la constante de dis-

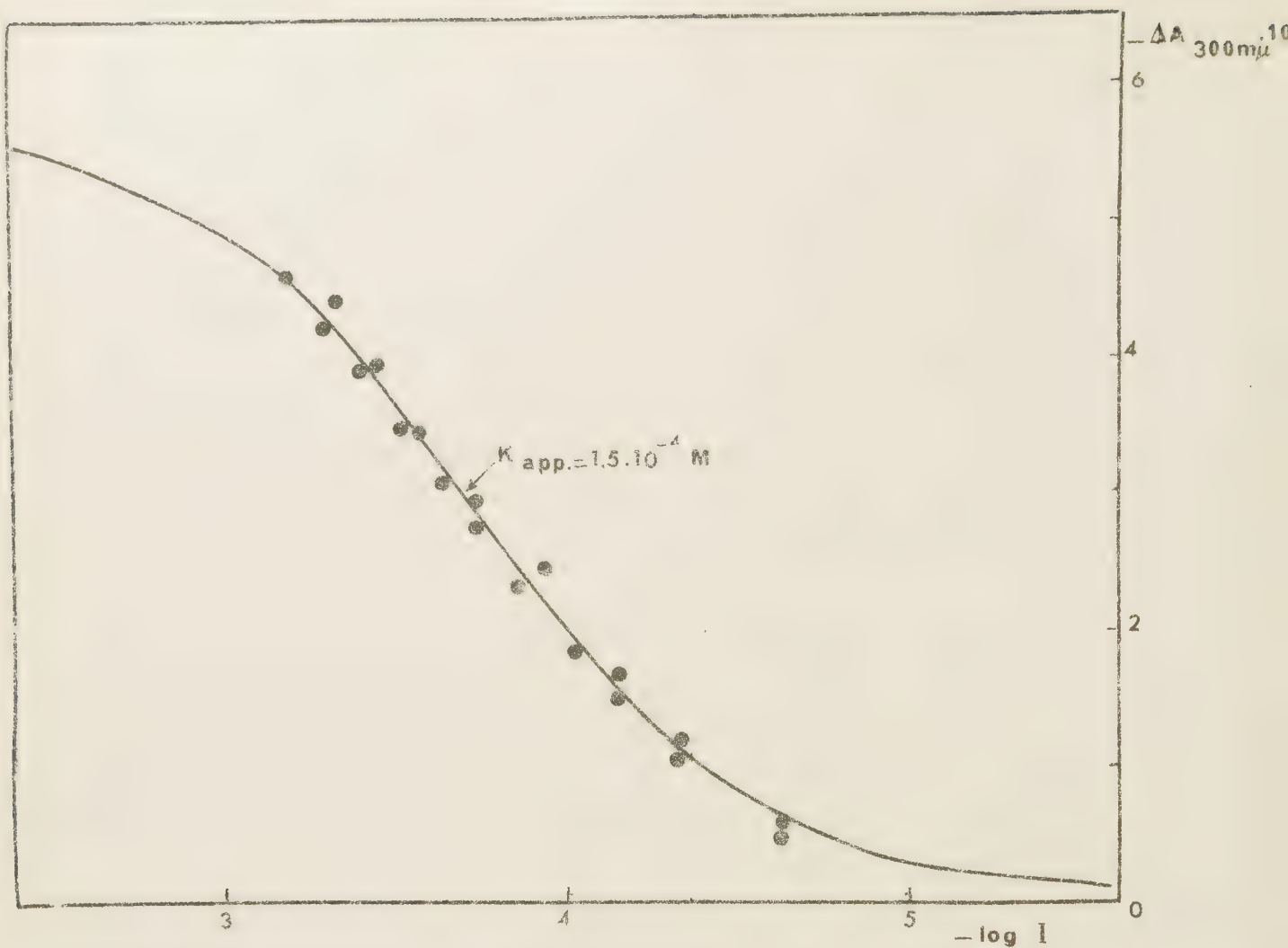
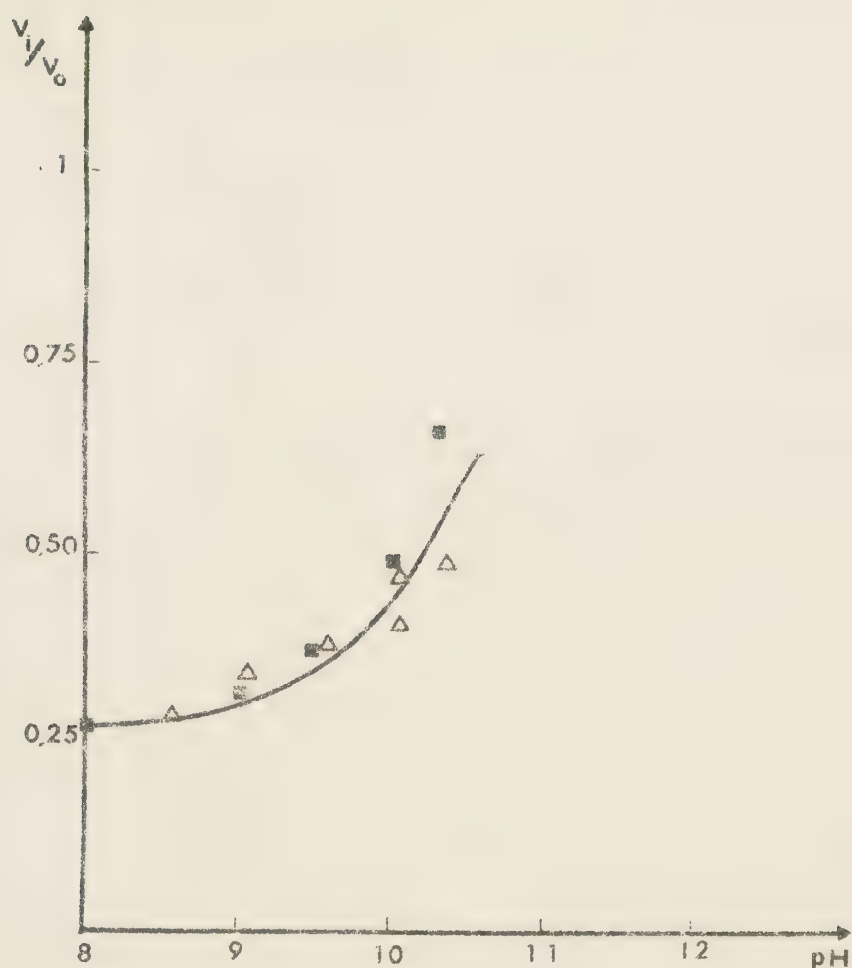


FIGURE 33

Variation de l'absorbance à 300 $m\mu$ de la trypsine en fonction de $-\log$ (benzamidine).

Conditions expérimentales : pH 10,9 $\mu = 0,3$ - $\theta = 15^\circ$ -

(enzyme) = $5,6 \cdot 10^{-5} M$ - échelle d'absorbance : 0 - 0,1 (une cale optique est placée dans le faisceau de référence). Les valeurs des points expérimentaux sont corrigées de l'effet de dilution et de l'absorbance propre de la benzamidine.

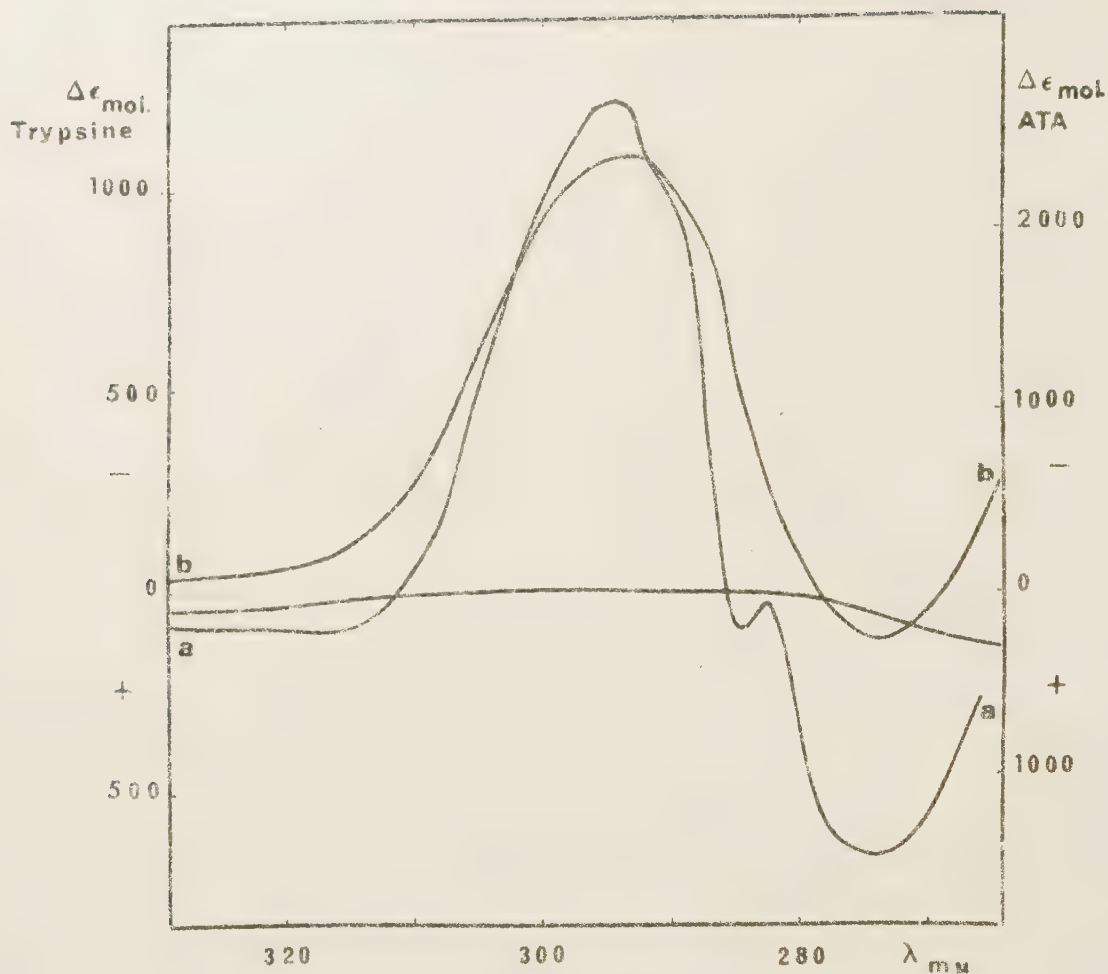


F I G U R E 34

Inhibition de l'hydrolyse trypsique du N- α -acétyl-L-phényl-alanineméthylester ($2 \cdot 10^{-3}$ M) par la benzamidine ($5,6 \cdot 10^{-5}$ M) (Δ) et par la N- α -benzoyl-L-arginine (10^{-2} M) ($\bullet$), entre pH 8 et 10,3.

Représentation des rapports des vitesses d'hydrolyse en présence et en absence d'inhibiteur.

La courbe est calculée pour une valeur de K de 10^{-10} .



F I G U R E 35

Spectre a : Spectre de différence d'absorption de solutions de trypsine en absence (cuve de référence) et en présence de butylamine 0,17 M (cuve de mesure).

Conditions expérimentales : pH 11,0 - $\theta = 10^\circ$ - $\mu = 0,3$ - (enzyme) = 0,49 mg/ml = $2,1 \cdot 10^{-5}$ M.

Spectre b : Spectre de différence d'absorption de solutions de N- α -acétyl-L-tyrosine amide (ATA) 10^{-5} M à pH 12 (cuve de référence) et à pH 7 (cuve de mesure). La valeur de $\Delta\epsilon$ obtenue à 293 mμ est de 2 400, en bon accord avec celle déterminée par Martin et al.⁽⁹⁷⁾.

sociation du complexe trypsine-benzamidine à pH 10,9 (fig.33). La valeur de $(L)_{1/2}$ ainsi déterminée est égale à $1,5 \cdot 10^{-4} M$; elle est près de six fois plus forte qu'à pH neutre et traduit donc une importante diminution d'affinité de l'inhibiteur pour la trypsine.

Inhibition de l'hydrolyse trypsique du N- α -acétyl-L-phényl-alanine méthyl ester (APheME) par la benzamidine et la N- α -benzoyl-L-arginine (BA). La diminution d'affinité des inhibiteurs compétitifs pour la trypsine lorsque le pH s'élève au-delà de pH 8,5 peut être également mise en évidence par étude de la variation en fonction du pH de leur pouvoir inhibiteur sur la catalyse de l'hydrolyse d'un substrat de l'enzyme.

Le rapport $\frac{v_i}{v_o}$ des vitesses d'hydrolyse d'un substrat en présence et en absence d'un inhibiteur compétitif est donné par l'expression $\frac{v_i}{v_o} = \frac{1}{1 + \frac{(I)}{K_i}}$, où (I) est la concentration en inhibiteur et K_i la constante d'inhibition. Toute variation de $\frac{v_i}{v_o}$ en fonction du pH est due à une variation de K_i en fonction du pH. Les résultats obtenus lors de l'étude de l'inhibition de l'hydrolyse de l'APheME par la benzamidine et par la N- α -benzoyl-L-arginine sont représentés sur la figure 34. On constate que les valeurs du rapport $\frac{v_i}{v_o}$ deviennent plus fortes lorsque le pH s'élève ; ce phénomène est dû à l'augmentation apparente de la constante d'inhibition. Une courbe représentant la variation de $\frac{v_i}{v_o} = \frac{1}{1 + \frac{(I)}{K_i (1 + \frac{K}{(H)})}}$ en fonction du pH, calculée en admettant pour K une valeur de 10^{-10} rend compte approximativement des résultats expérimentaux.

L'affinité de ces inhibiteurs pour la trypsine diminue donc, aux pH alcalins, suivant l'ionisation d'un résidu de l'enzyme dont le pK est égal à 10 environ ; il est raisonnable de penser qu'il s'agit du groupe responsable à la fois de la diminution d'activité²²⁻²⁴ et du changement de conformation de la trypsine aux pH alcalins.

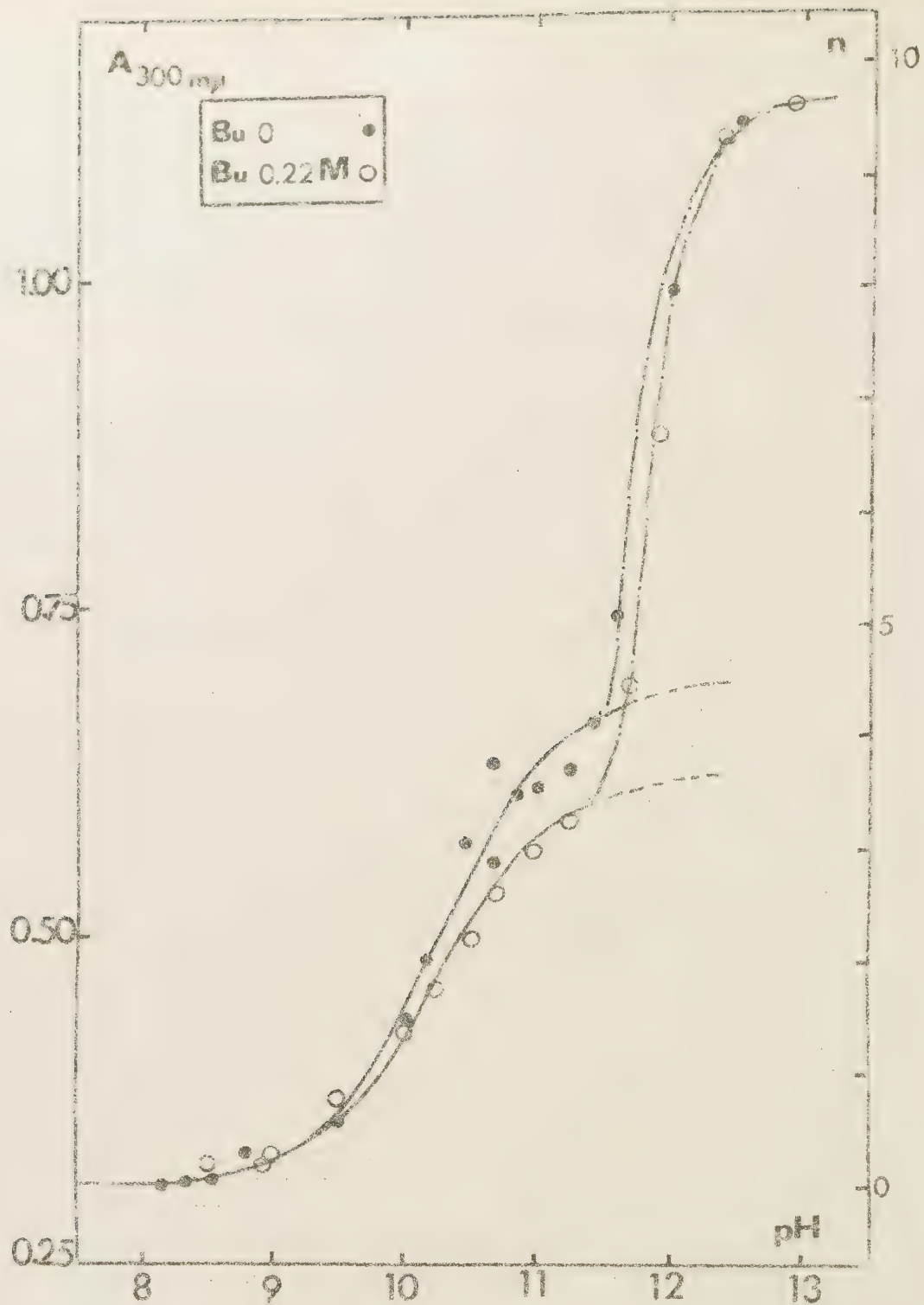


FIGURE 36

Effet du pH sur l'absorbance à 300 mμ d'une solution de trypsine 48,5 μM en absence et en présence de butylamine 0,22M. n représente le nombre de tyrosines titrées.

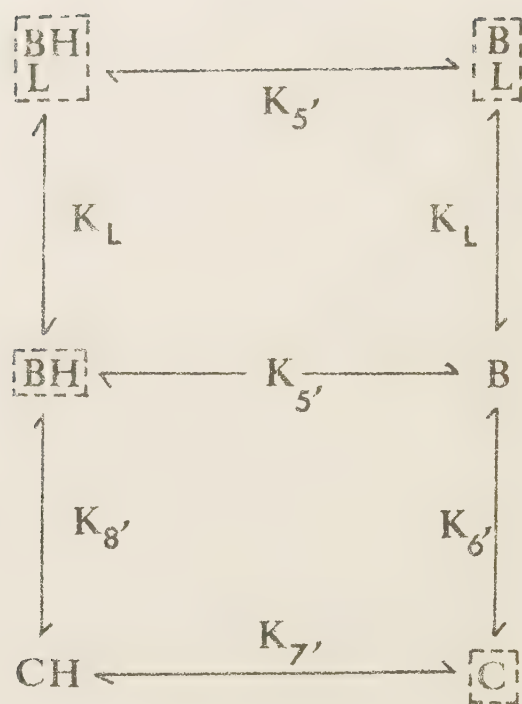
Un résultat identique a été obtenu dans le cas de la butylamine. En effet, contrairement à ce que nous avons cru ¹, l'affinité de cet inhibiteur pour la trypsine diminue lorsque le pH varie de 8 à 11 ; le maintien du pouvoir inhibiteur de la butylamine vis-à-vis de l'hydrolyse du N- α -benzoyl-L-arginine éthyl ester (BAEE) aux pH alcalins n'est qu'apparent, la vitesse d'hydrolyse du substrat étant également affectée par la protonation d'un groupement de l'enzyme de pK 10^{réf.96}.

Propriétés spectrophotométriques.

La fixation préférentielle, aux pH alcalins, des inhibiteurs par les formes "b" de la trypsine va s'accompagner non seulement d'une modification de la lévoration de la protéine, mais également d'une variation spectrale due au déplacement d'équilibre entre BH et C en faveur de BH. Sur la figure 35a est représenté le spectre de différence obtenu en comparant l'absorbance du complexe trypsine-butylamine à celle de la trypsine libre à pH 11, ce qui revient à comparer l'absorbance de BH (ou de BH_L) à celle de C. On constate qu'effectivement le complexe à pH alcalin a une structure différente de celle de l'enzyme (pics d'absorption à 284 et 274 m μ).

On observe d'autre part l'existence sur le spectre a d'un pic à 293m μ ; la comparaison de ce spectre à celui qui existe entre la fonction phénol d'une tyrosine à l'état protoné et à l'état ionisé (fig.35, spectre indique que le complexe possède à pH 11 en moyenne une demi tyrosine ionisée de moins que l'enzyme libre à ce pH. On obtient le même résultat par titrage des tyrosines de la trypsine libre et du complexe trypsine-butylamine (fig.36).

On peut penser que le changement de structure de la trypsine induit par la fixation de l'inhibiteur, correspondant à la transformation de C en BH et traduit ici par une perturbation des bandes d'absorption de la trypsine et par des modifications des effets Cotton des chromophores aromatiques (voir la figure 31), implique le masquage en milieu hydrophobe d'une tyrosine qui s'ionise librement dans la forme C à pH alcalin, mais



S C H E M A 6

non dans la forme BH à pH neutre (voir schéma 3, p.38). L'implication d'une ou de deux tyrosines dans le site hydrophobe de la trypsine a du reste été suggérée par Mares-Guia et Shaw⁹⁸. Différents auteurs ont par ailleurs mis en évidence que le spectre d'absorption de la trypsine était affecté par la fixation sur l'enzyme d'inhibiteurs protéiques⁹⁹⁻¹⁰³ ou de substrat¹⁰⁴.

2. Schéma théorique . Application aux résultats expérimentaux.

La fixation d'un inhibiteur compétitif par les différentes molécules de trypsine en milieu alcalin peut être représentée selon le schéma 6. (Les carboxyles de conformation et de fixation de la trypsine étant ionisés dans cette zone de pH, la lettre H indique que seul le groupement de pK apparent 10,1 est protoné ; son absence signifie que le groupement est ionisé. La lettre L représente l'inhibiteur compétitif).

De la même façon et pour les mêmes raisons qu'en milieu acide , on a admis que seules les formes "b" de l'enzyme étaient capables de fixer l'inhibiteur et qu'elles le fixaient avec la même affinité.

La variation en fonction du pH de la constante apparente de dissociation $(L)_{1/2}$ est donnée par l'expression suivante :

$$(L)_{1/2} = \frac{(BH) + (B) + (CH) + (C)}{\begin{matrix} (BH) \\ L \end{matrix} + \begin{matrix} (B) \\ L \end{matrix}}$$

$$= \frac{1 + \frac{K_{5'}}{(H)} + \frac{1}{K_{8'}} + \frac{K_{5'}}{K_{6'}(H)}}{\frac{1}{K_L} + \frac{K_{5'}}{K_L(H)}}$$

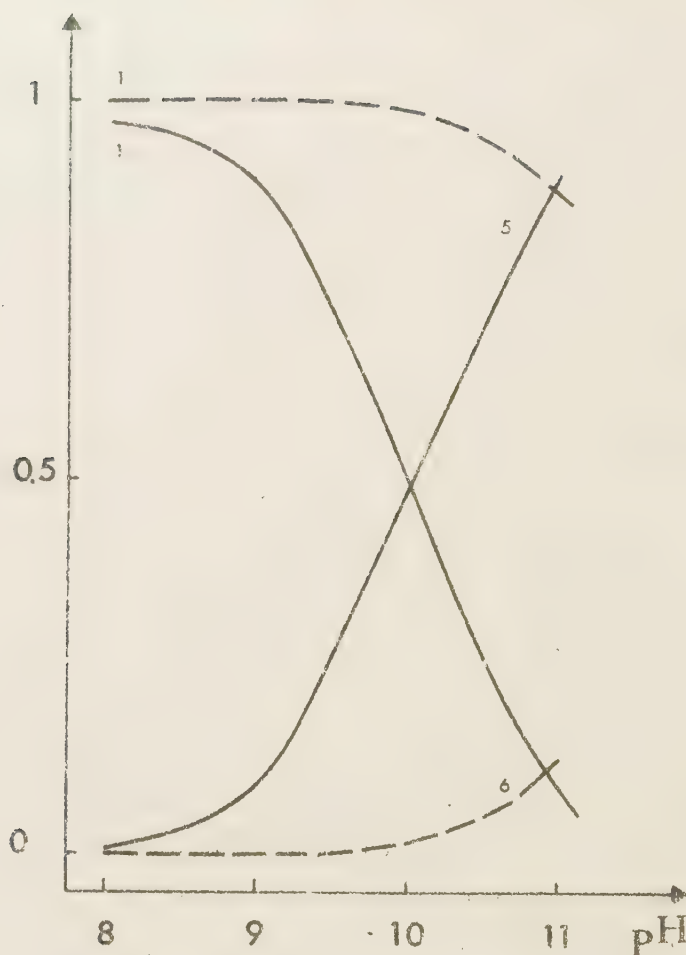


FIGURE 37

Les courbes sont calculées ; elles représentent la variation en fonction du pH, des fractions de molécules de trypsine sous ses principales formes.

Les courbes en trait plein sont relatives à l'enzyme libre ; celles en tirets sont relatives à l'enzyme en présence d'une concentration saturante de ligand (benzamidine). Les chiffres désignent les entités moléculaires .

1: BH et BH ; 5: C ; 6: B.
L L L

Les valeurs de K_5 , K_6 , K_7 , et K_8 , sont celles qui ont été adoptées précédemment lors de l'étude de l'effet du pH sur le pouvoir rotatoire spécifique de la trypsine : $K_5 = 1,6 \cdot 10^{-12}$, $K_6 = 1,6 \cdot 10^{-2}$, $K_7 = 5 \cdot 10^{-9}$ et $K_8 = 5 \cdot 10^1$. La constante de dissociation K_L du complexe trypsine benzamidine est égale, nous l'avons vu, à $2,7 \cdot 10^{-5}$ M.

A pH 10,9, la valeur de $(L)_{1/2}$ calculée est égale à $2,1 \cdot 10^{-4}$ M ; étant donné la faible précision des mesures dans cette zone de pH, l'accord avec la valeur expérimentale de $1,5 \cdot 10^{-4}$ M est relativement satisfaisant.

De même qu'en milieu acide, la fixation d'un inhibiteur compétitif par la trypsine protège celle-ci contre la transconformation alcaline puisque le complexe conserve la structure de "b" jusqu'à pH 11. La variation en fonction du pH de la fraction de molécules de trypsine sous ses principales formes en absence et en présence d'une concentration saturante en benzamidine a été calculée et est représentée sur la figure 37. On remarque que B, qui représente une fraction tout à fait négligeable des molécules de l'enzyme libre est en proportion appréciable sous la forme $\frac{B}{L}$.

IV. Conclusion.

L'étude de la fixation par la trypsine de plusieurs inhibiteurs compétitifs de l'enzyme a été effectuée entre pH 2 et 12,5.

Entre pH 5 et 8,5, dans la zone de pH où la protéine est essentiellement sous forme BH, la formation du complexe trypsine-inhibiteur s'accompagne d'une modification des propriétés optiques de la protéine et également, dans les cas où le phénomène est observable expérimentalement, de celles de l'inhibiteur. Il y a donc ajustement des conformations des molécules qui interagissent.

La formation du complexe enzyme-inhibiteur peut cependant s'effectuer sans modification appréciable de la structure de l'enzyme, comme c'est le cas du complexe trypsine-butylamine. On peut donc penser que, aux pH neutres, sous la forme BH, la molécule de trypsine possède non seulement

la conformation mais également l'état d'ionisation favorables à la fixation d'un inhibiteur compétitif.

Cette hypothèse n'est plus valable, ni aux pH supérieurs à 8,5, lorsque la concentration en molécules de trypsine sous forme "c" augmente, ni aux pH inférieurs à 5, lorsque la concentration en molécules de trypsine sous forme "a" augmente et que le groupement carboxylique, de pK environ 4,5, qui participe à la fixation de l'inhibiteur se protone. On a observé en effet que l'affinité des inhibiteurs pour la trypsine dépend d'une part de l'ionisation de ce résidu carboxylique et d'autre part de celle des groupements de pK apparents 3,7 et 10,1 responsables des transformations réversibles de la trypsine de "b" en "a" et "c".

Les résultats obtenus indiquent que la trypsine sous ces deux dernières formes "a" et "c" ne fixe par l'inhibiteur ; la formation du complexe enzyme-inhibiteur en milieu acide et alcalin s'accompagne en effet d'un déplacement d'équilibre en faveur des formes "b" et donc d'un changement "apparent" de la conformation de la trypsine. Celui-ci se greffe bien entendu sur le changement de conformation "réel" éventuellement observé à pH neutre.

Parmi les molécules de trypsine sous forme "b", celles dont le groupement carboxylique de fixation est ionisé (BH, BHH et B) fixent naturellement l'inhibiteur avec une meilleure affinité que celles dont ce groupement est protoné (BH et BHH); ces dernières peuvent cependant former un complexe enzyme-inhibiteur^H par interaction entre les portions hydrophobes des deux molécules.

La nature des trois groupements ionisables qui interviennent directement ou indirectement dans la fixation d'un inhibiteur compétitif par la trypsine n'est pas connue. On peut seulement faire des hypothèses basées principalement sur des comparaisons entre la trypsine et la chymotrypsine.

Les groupes responsables des changements de conformation- et d'activité- de la trypsine pourraient être l'isoleucine N terminal 7 et l'acide aspartique 182. Il a été mis en effet en évidence dans le cas de la chymotrypsine d'une part qu'il existait une liaison électrostatique entre l'acide

aspartique voisin de la sérine "active " et l'isoleucine N terminal ²⁶ et d'autre part que ce dernier acide-aminé était responsable du changement de conformation et d'activité de l'enzyme à pH alcalin ^{43,105-107}. Il a été montré par ailleurs par Scrimger et Hofmann ¹⁰⁸ que le marquage chimique de l'isoleucine N terminal de la trypsine provoquait l'inactivation de l'enzyme.

En raison également des analogies qui existent avec la séquence primaire de la chymotrypsine, Smillie et Hartley ¹⁰⁹ ont suggéré qu'un des deux groupes carboxyliques présents dans le trypsinogène et non dans le chymotrypsinogène devait faire partie du site de fixation de la trypsine ; l'acide glutamique 173, plus proche de la sérine "active" 183 que l'acide aspartique 90, pourrait être le site anionique de l'enzyme ¹¹⁰.

C O N C L U S I O N

L'étude des changements de conformation de la trypsine de boeuf sous l'action du pH, de la température, de la concentration en protéine et de la fixation d'inhibiteurs compétitifs de l'enzyme a apporté l'ensemble des résultats suivants .

Aux températures de 10 à 15°, la trypsine existe entre pH 2 et 11 sous un nombre limité d'états macroscopiques, en équilibres réversibles. Indépendamment de la charge de la molécule, on a distingué schématiquement trois conformations principales , "a", "b" et "c", prépondérantes respectivement aux pH acide , neutre et alcalin, sous les formes AHH, BH et C.

La transformation réversible de BH en AHH ou en C est liée soit à la protonation d'un groupement de pK apparent 3,7, soit à la déprotonation d'un groupement de pK apparent 10,1 ; cette transformation implique un déploiement limité d'une portion de la chaîne polypeptidique, accompagné du démasquage de tyrosines et de tryptophanes. La similitude des propriétés rotatoires de AHH et de C suggère une analogie de structure spatiale des deux conformations "a" et "c".

L'étude de l'effet de la température sur les propriétés optiques de la trypsine, effectuée entre pH 1 et 3,7 , permet de mettre en évidence l'existence d'un quatrième état macroscopique "d", stable aux températures élevées et caractérisé essentiellement par une structure largement en contact avec le solvant, assimilable à la pelote statistique. La transformation de "a" ou de "b" en "d" est réversible et elle est de type coopératif.

On a mis en évidence que l'affinité des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme pour la trypsine sous forme "b" est beaucoup plus grande que leur affinité pour la trypsine sous forme "a" ou "c". La formation du complexe enzyme-inhibiteur s'accompagne alors d'une modification des équilibres entre les différentes molécules de la trypsine en faveur des formes "b"; la formation du complexe "protège" ainsi la protéine contre les transconformations acide et alcaline.

La fixation d'un inhibiteur compétitif par l'enzyme en fonction du pH dépend donc de l'ionisation des groupements de pK apparents 3,7 et 10,1 responsables des transconformations ; elle dépend également de l'état d'ionisation d'un résidu carboxyle de pK 4,5 qui interagit sous sa forme anionique avec la charge positive de l'inhibiteur.

La polymérisation de la trypsine, étudiée à pH 4,8, est un phénomène lent. Elle est totalement réversée lors de la formation du complexe enzyme-inhibiteur ; il y a donc compétition entre les groupes ionisables qui assurent la polymérisation de l'enzyme et la fixation de l'inhibiteur. Seule la forme monomère de la trypsine semble être "active".

B I B L I O G R A P H I E

1. A.d'ALBIS et J.J. BECHET,
Biochim. Biophys. Acta, 140, (1967), 435
2. K.A.WALSH et H.NEURATH,
Proc. Natl. Acad. Sci.U.S., 52, (1964), 884
3. O.MIKES, V.TOMASEK, V. HOLEYSOVSKY et F.SORM,
Biochim. Biophys. Acta, 117, (1966), 281
4. V.HOLEYSOVSKY, B.MESROB,V.TOMASEK,O.MIKES et F. SORM,
Collection Czechoslov.Chem. Commun., 33, (1968), 441
5. O.MIKES, V.TOMASEK, V.HOLEYSOVSKY et F. SORM,
Collection Czechoslov. Chem. Commun., 32, (1967), 655
6. J.LABOUESSE et M.GERVAIS,
European J.Biochem., 2 , (1967), 215
7. S.MAROUX, M.ROVERY et P. DESNUELLE,
Biochim. Biophys. Acta, 140, (1967), 377
8. D.D.SCHROEDER et E. SHAW,
J.Biol.Chem., 243, (1968), 2943
9. B.S. HARTLEY,
Ann. Revs.Biochem., 29, (1960), 45
10. M.L.BENDER et F.J. KEZDY,
Ann. Revs. Biochem., 34, (1965), 49

M.L. BENDER, F.J. KEZDY et J. FEDER,
J.Am. Chem. Soc., 87, (1965), 4953
11. T. INAGAMI,
J.Biol. Chem., 239, (1964), 787

12. M.MARES-GUIA et E.SHAW,
J.Biol. Chem., 240, (1965),1579
M.MARES-GUIA, E.SHAW et W.COHEN,
J.Biol.Chem., 242, (1967),5777
13. J.A. STEWART et J.E. DOBSON,
Biochemistry, 4 , (1965), 1086
14. E.J.EAST et C.G. TROWBRIDGE,
Arch. Biochem. Biophys., 125, (1968), 334
15. A.Y.MOON, J.MERCOUROFF et G.P. HESS,
J.Biol.Chem., 240, (1965), 717
16. G.JOHANNIN et J.YON,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 25, (1966),320
17. H.GUTFREUND,
Trans. Faraday Soc., 51, (1955),441
18. J.J. BECHET,
J.Chim. Phys., 61, (1964), 584
19. E.SHAW, M.MARES-GUIA et W.COHEN,
Biochemistry, 4, (1965), 2219
20. V.TOMASEK, E.S. SEVERIN et F.SÖRM,
Biochem. Biophys. Res.Comm., 20, (1965), 545
21. E.F. JANSEN et A.K. BALLS,
J.Biol. Chem., 194, (1952), 721
22. J.J. BECHET,
J.Chim. Phys., 62, (1965), 1095
23. J.CHEVALLIER et J.YON,
Biochim. Biophys. Acta, 122, (1966), 116
24. S.S.WANG et F.H. CARPENTIER ,
J.Biol. Chem., 243, (1968), 3702

25. B.W. MATTHEWS, P.B. SIGLER, R.HENDERSON et D.M. BLOW,
Nature, 214, (1967), 652
26. P.B. SIGLER, D.M.BLOW, B.W. MATTHEWS et R.HENDERSON,
J.Mol. Biol., 35, (1968), 143
27. P.DRUDE,
"Lehrbuch der Optik ", Hirzel, Leipzig, 1900
28. W. MOFFITT,
J. Chem. Phys., 25, (1956), 467
29. E.R. BLOUT, J.P. CARVER et E. SHECHTER,
dans " Optical rotatory dispersion and circular dichroism in
organic chemistry ", G.Snatzke, London, NW 4, 1967,p.224.
30. N.GREENFIELD, B. DAVIDSON et G.D. FASMAN,
Biochemistry, 6, (1967), 1630
31. D.B. WETLAUFER,
Adv. in Prot. Chem., 17, (1962), 303
32. P.DEBYE,
J. Phys. Chem., 51, (1947), 18
33. M. KUNITZ et J.H. NORTHROP,
J.Gen.Physiol., 17, (1934), 591
34. A. d'ALBIS,
Compt.Rend. Acad. Sci., 257, (1963), 2341
35. C. GROS,
Communication personnelle
36. J.J. BECHET, M.C. GARDIENNET et J.YON,
Biochim. Biophys. Acta, 122, (1966), 101
37. S.A. BERNHARD et H. GUTFREUND,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 53, (1965), 1238
38. A. ALBERT,
"The Acridines ", Edward Arnold and Co, London, 1951

39. A.N. GLAZER,
Proc. Natl .Acad. Sci. U.S., 54, (1965), 171
40. S.GUINAND et J.TONNELAT,
J.Chim. Phys., 51, (1954), 177
41. A. d'ALBIS,
Compt. Rend. Acad. Sci., 262, (1966), 574
42. M.BIER et F.F. NORD,
Arch. Biochem. Biophys., 33, (1951), 320
43. H.L. OPPENHEIMER, B.LABOUESSE et G.P. HESS,
J.Biol. Chem., 241, (1966), 2720
44. M. LAZDUNSKI et M.DELAAGE,
Biochim. Biophys. Acta, 105, (1965), 541
45. J.F. RIORDAN, W.E.C. WACKER et B.L. VALLEE,
Nature, 208, (1965), 1209
46. H. WURZ et F. HAUROWITZ,
J.Am. Chem. Soc., 83, (1961), 280
47. Z. BOHAK,
J.Biol. Chem., 239, (1964), 2878
48. J.W. DONOVAN,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, (1967), 734
49. M. LAZDUNSKI et M. DELAAGE,
Biochim. Biophys. Acta, 140, (1967), 417
50. A.d'ALBIS,
Compt. Rend. Acad. Sci., 262, (1966), 1888
51. D.PANTALONI, A. d'ALBIS et P. DESSEN,
J.Chim. Phys., 65, (1968), 196
52. A. ROSENBERG,
J.Biol. Chem., 241, (1966), 5119
53. K. IMAHORI,
Biochim. Biophys. Acta, 37, (1960), 336

54. D.PANTALONI,
Thèse de Doctorat , Orsay, 1965
55. J.T. YANG,
dans G.N. Ramachandran , "Conformation of biopolymers ",
Vol.I, Academic Press, London and New-York, 1967, p.157
56. G. KARTHA, J.BELLO et D. HARKER,
Nature, 213, (1967), 862
57. J.A. SCHELLMAN et M.J. LOWE,
J.Am. Chem. Soc., 90 ,(1968), 1070
58. Y.P. MYER et L.H. Mc DONALD,
J.Am. Chem. Soc., 89, (1967), 7142
59. A. d'ALBIS,
Compt. Rend. Acad. Sci., 259, (1964), 1819
60. G. WEBER,
Biochem. J., 75, (1960), 335
61. M. DELAAGE et M. LAZDUNSKI,
Biochim. Biophys. Acta, 105, (1965), 608
62. J.W. DONOVAN,
Biochemistry, 6 , (1967), 3918
63. J.W. BRIDGES et R.T. WILLIAMS,
Biochem. J., 107, (1968), 225
64. Y. INADA, M.KAMATA, A. MATSUSHIMA et K. SHIBATA,
Biochim. Biophys. Acta, 81, (1964), 323
65. M. LAZDUNSKI,
Biochim. Biophys. Acta, 92, (1964), 418
66. D.C. POLAND et H.A. SCHERAGA ,
Biopolymers, 3 , (1965), 401
67. J. HERMANS Jr. et H.A. SCHERAGA ,
J.Am. Chem. Soc., 83, (1961), 3283

68. A.W. KLEE,
Biochemistry, 6, (1967), 3736
69. R. LUMRY, R.L. BILTONEN et J.F. BRANDTS,
Biopolymers, 4 , (1966), 917
70. J.F. BRANDTS,
J.Am. Chem. Soc., 86, (1964), 4291 et 4302
71. R.L. BILTONEN et R. LUMRY,
J.Am. Chem. Soc., 87, (1965), 4208
72. F.M. POHL,
European J. Biochem., 4 , (1968), 373
73. N.C. PACE et C. TANFORD,
Biochemistry , 7 , (1968), 198
74. J. HERMANS Jr. et G. ACAMPORA,
J.Am. Chem. Soc., 89, (1967), 1547
75. M. BRUNORI, E. ANTONINI, P. FASELLA, J. WYMAN et A.ROSSI-FANELLI,
J.Mol. Biol., 34, (1968), 497
76. J.F. BRANDTS et L. HUNT,
J.Am. Chem. Soc., 89, (1967), 4826
77. K.C. AUNE, A. SALAHUDDIN, M.H. ZARLENGO et C.TANFORD,
J.Biol. Chem. , 242, (1967), 4486
78. L.W. CUNNINGHAM Jr., F.TIETZE, N.M. GREEN et H. NEURATH,
Discussions Faraday Soc., 13 , (1953), 58
79. S. GUINAND,
Compt. Rend. Acad. Sci., 245, (1957), 1672
80. B. ARRIO,
Compt. Rend. Acad. Sci. , 264, (1967), 1331
81. B. ARRIO,
Thèse de spécialité, Orsay , 1967

82. R. EGAN, H.O MICHEL, R.SCHLUETER et B.J. JANDORF,
Arch. Biochem. Biophys., 66, (1957), 366
83. R.B. MARTIN et C. NIEMANN,
J.Am. Chem. Soc., 80, (1958), 1473
84. F. KEZDY et M.L. BENDER,
Biochemistry, 4 , (1965), 104
85. T. INAGAMI et J.M. STURTEVANT,
Biochemistry, 4 , (1965), 104
86. P.S. SARFARE, G. KEGELES et S.J. KWON-RHEE,
Biochemistry, 5 , (1966), 1389
87. I.V. BEREZIN, G.Ya.KOLOMIITSEVA, A.V. LEVASHOV et K.MARTINEK,
Doklady Akademii Nauk SSSR, 171, (1966), 411
88. K. MORIMOTO et G.KEGELES,
Biochemistry, 6 , (1967), 3007
89. D.E. KOSHLAND Jr.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 44, (1958), 98
90. W.P. JENCKS,
dans N.O. Kaplan et E.P. Kennedy, "Current aspects of
biochemical energetics " , Academic Press, New-York, 1966 ,p.273
91. R.J. FOSTER,
Federation Proc., 27, (1968), 784
92. J.A. STEWART et L. OUELLET,
Can. J.Chem., 37, (1959), 751
93. H. PARKER et R. LUMRY,
J.Am. Chem. Soc., 85, (1963), 483
94. B.H. HAVSTEEN et G. P. HESS,
J.Am. Chem. Soc., 85, (1963), 791
95. J.J. BECHET, J.CHEVALLIER, J.LABOUESSE, B.ARNOULD, S.ALDIN-CICARELLI
et J. YON ,
Biochim. Biophys. Acta, 151, (1968), 165

96. J.J. BECHET,
Résultats non publiés
97. R.R. MARTIN, J.T. EDSALL, D.B. WETLAUFER et B.R. HOLLINGWORTH,
J.Biol. Chem., 233, (1958), 1429
98. M.MARES-GUIA et E. SHAW,
J.Biol. Chem., 242, (1967), 5782
99. H. EDELHOCH et R.F. STEINER,
J.Biol. Chem., 240, (1965), 2877
100. T.F. SPANDE, N.M. GREEN et B. WITKOP,
Biochemistry, 5 , (1966), 1926
101. R.F. STEINER,
Biochemistry, 5 , (1966), 1964
102. P.BENMOUYAL et C.G. TROWBRIDGE,
Arch. Biochem. Biophys., 115 , (1966), 67
103. G. FEINSTEIN et R.E. FEENEY,
J.Biol. Chem., 241, (1966), 5183
104. D.T. ELMORE et J.J. SMYTH,
Biochem. J. , 107, (1968), 103
105. C.GHELIS, J. LABOUESSE et B. LABOUESSE,
Biochem. Biophys. Res. Comm., 29, (1967), 101
106. A. HIME, P.C.PARKS et G.P. HESS,
J.Biol. Chem., 242 , (1967), 919
107. D.KARTBIAN, C.LAURENT, J.LABOUESSE et B.LABOUESSE ,
European J. Biochem., 5 , (1968), 260
108. S.T. SCRIMGER et T. HOFMANN,
J.Biol. Chem., 242 ,(1967), 2528
109. L.B. SMILLIE et B.S. HARTLEY,
Biochem. J. , 101, (1966), 232
110. L.B.SMILLIE, A.FURKA, N.NAGABHUSHAN, K.J.STEVENSON ET C.O.PARKES,
Nature, 218 , (1968), 343 .

